Untersuchungen über den modulierenden Einfluß von Tetrahydronorharman (THN) auf serotonerge Neurone mit Hilfe der Superfusionstechnik

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Mechthild Neises
aus Wasserliesch

Berlin ~~1983~~
1984

UNIV.
LEIDEN
EXL.

Aus dem Institut für Neuropsychopharmakologie
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H. Coper

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN MODULIERENDEN EINFLUSS VON TETRAHYDRONORHARMAN (THN) AUF SEROTONERGE NEURONE MIT HILFE DER SUPERFUSIONSTECHNIK

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Mechthild Neises
aus Wasserliesch

Berlin 1983

Referent: Prof. Dr. H. Rommelspacher

Korreferent: Prof. Dr. H.-G. Baumgarten

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 16.08.84

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
A.	EINLEITUNG.....	1
B.	PROBLEMSTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT.....	14
C.	MATERIAL UND METHODEN.....	18
C.I.	Material.....	18
C.I.1.	Versuchstiere.....	18
C.I.2.	Chemikalien.....	18
C.I.2.a.	Verabreichte Pharmaka.....	18
C.I.2.b.	Sonstige Chemikalien.....	19
C.I.3.	Geräte.....	20
C.II.	Behandlung der Tiere.....	20
C.III.	Präparation der Gehirne.....	21
C.IV.	Bestimmung der spezifischen Ausschüttung von ^{3}H-Serotonin und ^{14}C-THN mit Hilfe der Superfusionstechnik.....	23
C.IV.1.	Darstellung des Superfusionssystems.....	23
C.IV.2.	Beschreibung des experimentellen Verfahrens.	25
C.IV.2.a.	Inkubation mit ^{3}H-Serotonin.....	29
C.IV.2.b.	Inkubation mit ^{14}C-THN.....	29
C.IV.2.c.	Doppelmarkierung mit ^{3}H-Serotonin und ^{14}C-THN.....	29
C.V.	Auswertung der Versuchsergebnisse mittels statistischer Verfahren.....	30
C.V.1.	Statistische Analyse des THN-Einflusses auf die ^{3}H-5HT-Freisetzung.....	30
C.V.2.	Statistischer Nachweis des Hemmeffekts niedriger THN-Konzentrationen auf die K^{+}-induzierte ^{3}H-5HT-Ausschüttung.....	37
D.	ERGEBNISSE.....	39
D.I.	THN-Einfluß auf die ^{3}H-5HT-Freisetzung.....	39

Seite

D.I.1. Vorversuche nach Inkubation mit ^{3}H-5-HT..... 39
D.I.1.a. ^{3}H-Freisetzung in Abhängigkeit von der K^{+}-Konzentration und der Depolarisationszeit.... 39
D.I.1.b. ^{3}H-Freisetzung nach Reserpin-Vorbehandlung... 45
D.I.2. Einfluß ansteigender THN-Konzentrationen auf die ^{3}H-Freisetzung..... 49
D.I.3. Abhängigkeit des THN-Effekts von der Ca^{++}-Konzentration..... 73
D.II. Spezifische Ausschüttung von THN..... 77
D.II.1. Vorversuche nach Inkubation mit ^{14}C-THN..... 77
D.II.1.a. ^{14}C-Freisetzung in Abhängigkeit von der ^{14}C-THN-Konzentration während der Inkubation..... 77
D.II.1.b. ^{14}C-Freisetzung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit..... 84
D.II.2. ^{14}C-Freisetzung in Abhängigkeit von der Ca^{++}-Konzentration..... 90
D.II.3. ^{14}C-Freisetzung nach Reserpin-Vorbehandlung.. 98
D.III. Spezifische Ausschüttung von THN und 5-HT gleichzeitig..... 103
D.III.1. ^{3}H- und ^{14}C-Freisetzung nach Inkubation mit ansteigenden ^{3}H-5HT-Konzentrationen bei konstanter ^{14}C-THN-Konzentration..... 103
D.III.2. ^{3}H- und ^{14}C-Freisetzung nach Inkubation mit ansteigenden ^{14}C-THN-Konzentrationen bei konstanter ^{3}H-5HT-Konzentration..... 115

E. DISKUSSION..... 126
E.I. Präparat und Methode..... 126
E.II. Spezifität der Transmitterausschüttung..... 130
E.III. THN-Einfluß auf die spezifische 5-HT-Ausschüttung..... 138
E.IV. THN als mutmaßlicher Transmitter..... 149
E.V. THN als 'Cotransmitter' oder 'falscher Transmitter'..... 155

Seite

F. TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE..... 159

G. LITERATURVERZEICHNIS..... 165

Liste der Abkürzungen

ACh	Acetylcholin
ATPase	Adenosin 5'-triphosphatase
COMT	Catechol-O-methyltransferase
DA	Dopamin
GABA	γ-Aminobuttersäure
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
MAO	Monoaminoxidase
NA	Noradrenalin
THN	Tetrahydronorharman = 1,2,3,4-Tetrahydro-ß-Carbolin = 2,3,4,9-Tetrahydro-^{1}H-pyrido-[3,4-b]-indol
ZNS	Zentralnervensystem

(Weitere Erklärungen von wenig verwendeten Abkürzungen sind an der jeweiligen Textstelle angegeben.)

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht unter:

NEISES, M. & ROMMELSPACHER, H.
Influence of Tetrahydronorharmane (THN, Tetrahydro-ß-carboline) on the potassium-evoked efflux of (^{3}H)-5-HT and vice versa.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311 (1980) R 71

ROMMELSPACHER, H. & NEISES, M.
Evidence for Tetrahydronorharmane (THN, Tetrahydro-ß-carboline) as a putative neurotransmitter.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 308 (1979) R 42

A. E I N L E I T U N G

Die biogenen Amine dienen im ZNS neben verschiedenen anderen Substanzen wie Acetylcholin und γ-Aminobuttersäure der Übertragung von Nervenerregungen. Diese Übertragung hat man sich vereinfacht folgendermaßen vorzustellen (Abb. 1): Eine Depolarisation (1) führt zu einer Calciumionen-abhängigen Freisetzung von Transmittern aus den synaptischen Vesikeln durch Exocytose (2) oder durch einen anderen, noch ungeklärten Mechanismus (3). Die freigesetzten Transmitter verbinden sich mit einem, für jede Transmittersubstanz spezifischen, Rezeptor an der postsynaptischen Membran (4). Auf diese Weise wird, unter Umständen durch einen weiteren Überträger (cAMP) (5), das Signal (6) weitergegeben. Anschließend werden die Transmitter entweder von der Präsynapse wieder aufgenommen (7) oder enzymatisch abgebaut (8). In jüngeren Untersuchungen wurde der Einfluß des ausgeschütteten Transmitters auf präsynaptische Rezeptoren nachgewiesen (7). Diese Rezeptoren werden präsynaptisch genannt im Gegensatz zu den Rezeptoren der postsynaptischen Zelle. Damit besitzen die Neurone einen Re-

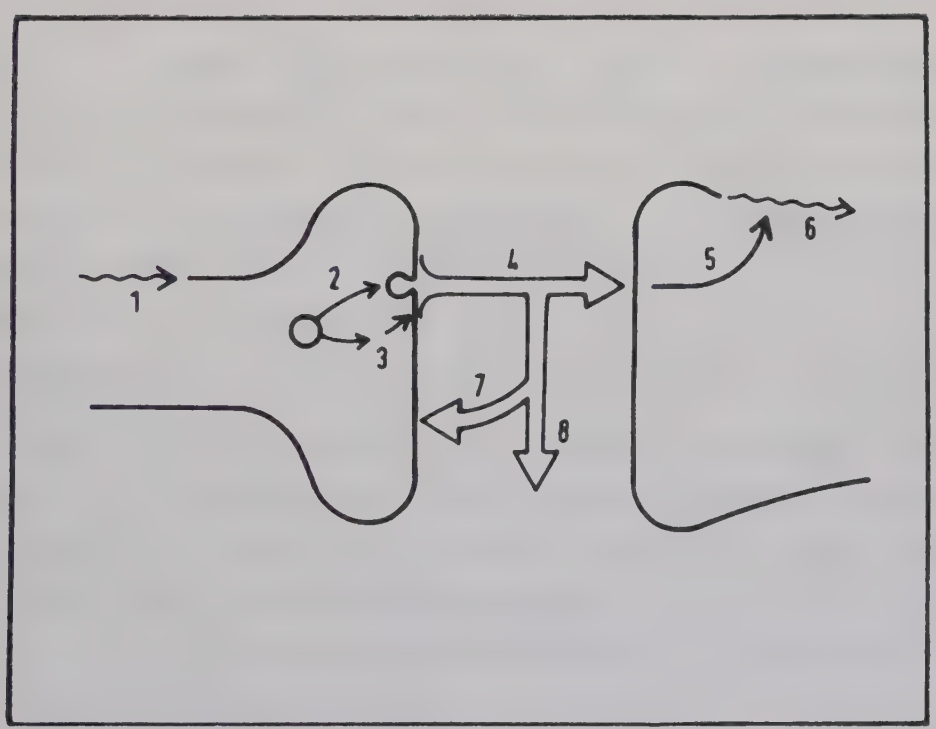


Abb. 1: Schematische Darstellung der chemischen Übertragung eines Nervenimpulses nach AGRANOFF (1975). Erklärung im Text.

zeptormechanismus, der die Transmitterausschüttung moduliert durch den Transmitter selbst bzw. durch strukturähnliche Substanzen. Nach dieser Hypothese wird die spezifische Ausschüttung eines Transmitters durch einen Feedback-Mechanismus reguliert. Der ausgeschüttete Transmitter erreicht im synaptischen Spalt eine Konzentrationsschwelle, die den präsynaptischen Rezeptor aktiviert und den negativen Feedback-Mechanismus auslöst, der wiederum eine weitere Transmitterausschüttung hemmt. Als Vermittler dieses Effekts dient möglicherweise cAMP. Der experimentelle Nachweis, der zur Postulierung dieses Mechanismus führte, basiert auf der Hemmung der Transmitterausschüttung in Gegenwart präsynaptischer Agonisten und der Steigerung der Transmitterausschüttung in Gegenwart präsynaptisch-blockierender Substanzen (ADLER-GRASCHINSKY & LANGER, 1975; STARKE & ENDO, 1976).

Da die Monoamine bei der Übertragung von Nervenerregungen eine entscheidende Rolle spielen, soll zum besseren Verständnis kurz auf die Hauptwege im Gehirnmetabolismus von 5-HT (5-Hydroxytryptamin) (Abb. 2) eingegangen werden. 5-HT wird aus der Aminosäure Tryptophan synthetisiert. Tryptophan kommt in freier und gebundener Form im Blut vor. Nur das freie Tryptophan, das mengenmäßig eng begrenzt ist, kann die Blut-Hirn-Schranke passieren. Durch das Enzym Tryptophan-Hydroxylase (TH) entsteht 5-Hydroxytryptophan (5HTP) (UDENFRIEND & TITUS, 1955; GAL et al., 1966, 1970). Der nächste Reaktionsschritt, die Decarboxylierung zum 5-HT, verläuft sehr viel rascher als der vorhergehende, so daß 5-HTP nur in sehr geringen Mengen im Gehirn vorkommt (MOIR & ECCLESTON, 1968). Nach der Freisetzung wird 5-HT durch das Enzym Monoaminoxidase (MAO, EC 1.4.3.4) desaminiert und oxydiert. Der entstandene Aldehyd wird durch die Aldehyddehydrogenase (EC 1.2.1.3) weiter metabolisiert. Dabei entsteht im Gehirn vornehmlich 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA).

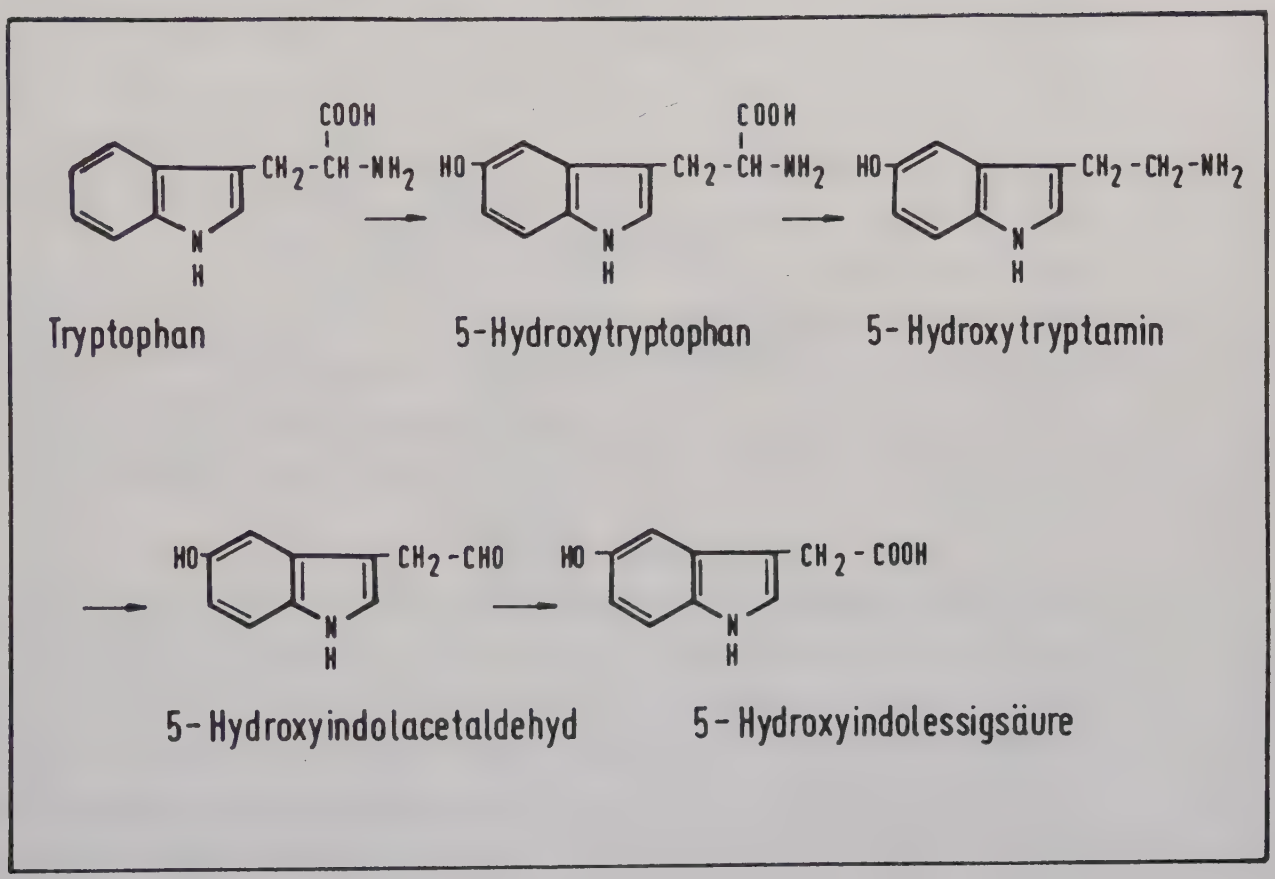


Abb. 2: Biosynthese und Abbau von 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) im ZNS.

Die biogenen Amine können mit der Falck-Hillarp-Technik (FALCK, 1962; FALCK et al., 1962), einer Fluoreszenz-Histochemischen Methode, so verändert werden, daß sie durch ihre unterschiedliche Fluoreszenz lichtmikroskopisch zu unterscheiden sind. Arbeitsgruppen um UNGERSTEDT ordneten mit dieser Methode spezifischen Neuronensystemen in einzelnen Hirnarealen jeweils eine Transmittersubstanz zu (ANDEN et al. 1966; FUXE et al., 1968, 1970a, 1970b). Serotonerge Neurone sind in allen Gehirnregionen in unterschiedlicher Dichte vorhanden, insbesondere im Striatum und Hypothalamus/Thalamus. Ihr Ursprung liegt hauptsächlich in den Raphé-Kernen. Einige Zellkörper befinden sich auch in Pons und Mesencephalon (Abb. 3). Zwischen den verschiedenen monoaminergen Zentren gibt es weit verzweigte axonale Verbindungen.
Pharmakologische und klinisch-biochemische Befunde sprechen für einen Zusammenhang zwischen dem Stoffwechsel der biogenen Amine und dem Auftreten von Geisteskrankheiten. So wird zum Beispiel die Entstehung manisch depressiver Psychosen auf eine Störung des NA- und 5-HT-Metabolismus zurückgeführt (Übersicht: MATUSSEK 1969 und 1972).

Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Katecholaminen und Indolen wurde oben in ihrer praktischen Bedeutung dargestellt (FALCK, 1962; BJÖRKLUND et al., 1973). In diesem Zusammenhang ist die Synthese einer speziellen Substanzengruppe von besonderem Interesse: Aus Katecholaminen werden durch Kondensation mit Formaldehyd Tetrahydroisochinoline gebildet, während aus Indolen Tetrahydro-ß-Carboline entstehen. Nach Dehydrierung und teilweiser Methylierung weisen die Dihydroverbindungen die stark fluoreszierende Eigenschaft auf.
Eine besondere Rolle spielen die ß-Carboline außerdem bei der Prüfung der Transmethylierungshypothese, die erstmalig von OSMOND & SMYTHIES (1952) formuliert wurde.

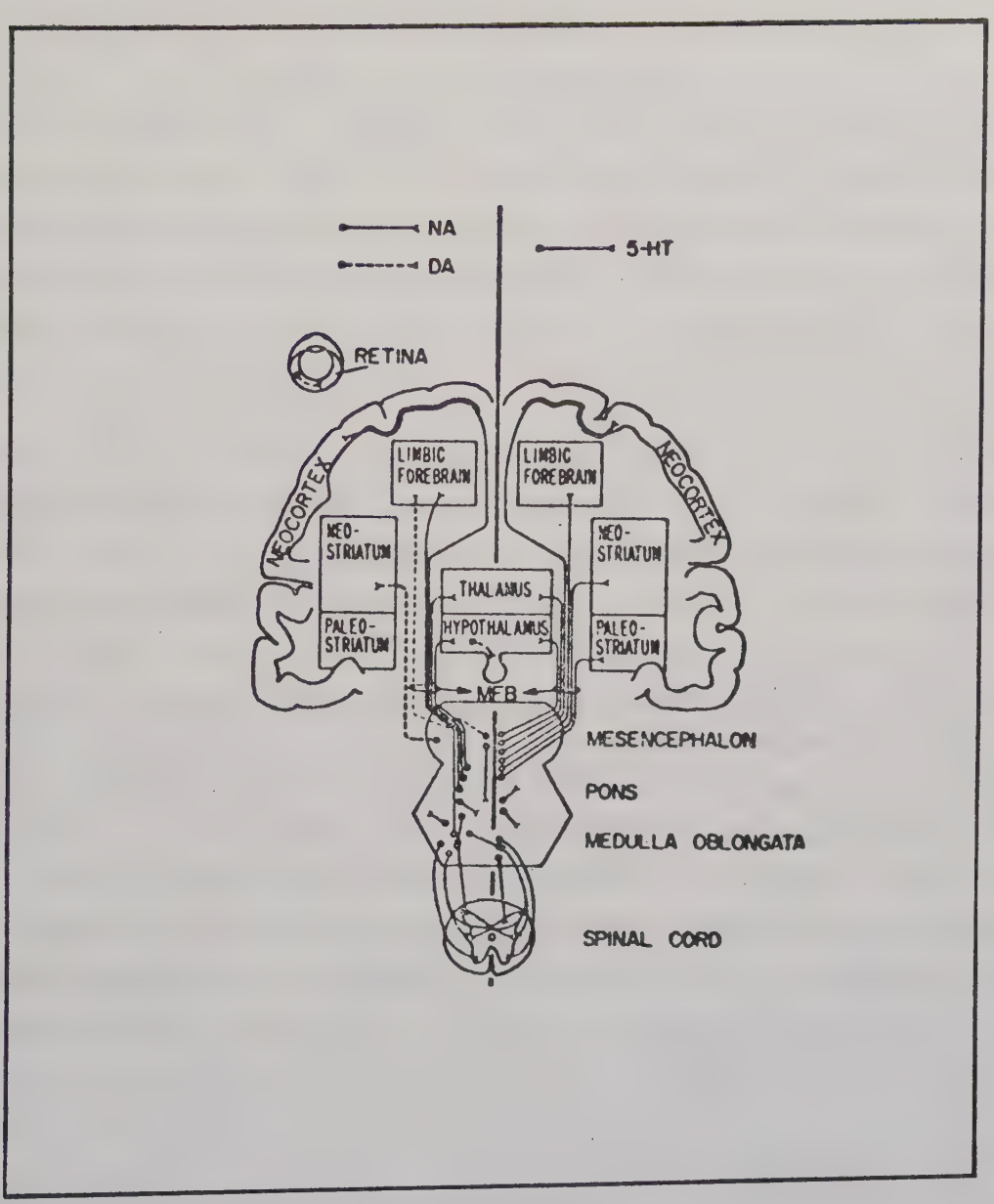


Abb. 3: Schematische, stark vereinfachte Darstellung der serotonergen sowie noradrenergen und dopaminergen Nervenbahnen im ZNS (nach ANDEN et al., 1966).

Dabei geht man von der Annahme aus, daß im Körper abnorme, psychotogene Methylierungsprodukte des Aminostoffwechsels (Bufotenin, N-Methyltryptamin etc.) gebildet werden, die zum Auftreten schizophrener Symptome führen (FRIEDHOFF & VAN WINKLE, 1962; Zusfsg. WYATT et al., 1971). Danach kann unter bestimmten Bedingungen die Konzentration der Abkömmlinge biogener Amine ansteigen und zu pathologischen Zuständen führen. Darüberhinaus ist bei der Untersuchung ihrer funktionellen Bedeutung fraglich, ob sie als Modulatoren die Wirkung der bekannten Transmitter verstärken oder abschwächen.
ß-Carboline können modulierend auf serotonerge Mechanismen wirken, indem sie die spezifische Wiederaufnahme von Serotonin in die Präsynapse hemmen (ROMMELSPACHER et al., 1976, 1978a). Auf diese Weise fördern sie die Serotoninwirkung im Bereich der Synapse. Dieser Effekt ist dem ähnlich, der durch Antidepressiva hervorgerufen wird. Es ist außerdem der Nachweis in vitro erbracht, daß diese Droge die Aktivität der Monoaminoxidase hemmt (BUCKHOLTZ & BOGGAN, 1977b; MELLER et al., 1977). Schon lange ist bekannt, daß ß-Carboline in der Flora vorkommen. Von den biologisch aktiven Substanzen seien Reserpin und Yohimbin genannt (CANTONI, 1975). Pharmakologisch werden die ß-Carboline als Harmane, Harmalaalkaloide oder Tryptoline bezeichnet (BARCHAS et al., 1974). Bei der Bezeichnung der Position von Substituenten wird von der chemischen Nomenklatur ausgegangen. Das ß-Carbolin des Serotonins wäre demnach das 6-OH-THN.
In der Literatur gibt es zahlreiche Spekulationen über die mögliche Bildung dieser Substanzen in vivo (TURNER, 1977; TIPTON et al., 1977; SOURKES, 1971; DAVIS, 1973). Da methylierte Abkömmlinge des Serotonins und Tryptamins eine schizophrenie-ähnliche Symptomatik auslösen können, wird nach dem Methyldonor und dem methylierenden Enzym gesucht. 5-Methyl-

tetrahydrofolat (Methyl-FH_4) ist als Methyldonor bei der enzymatischen N-Methylierung biogener Amine in verschiedenen Geweben bekannt (BANERJEE & SNYDER, 1973; LADURON, 1972). Weitere Untersuchungen zeigen jedoch, daß keine N-Methylierung von Indolen stattfindet, sondern daß die ß-Carboline durch Ringschluß entstehen (MANDEL et al., 1974; MELLER et al., 1975; WYATT et al., 1975). Unter Annahme eines Enzyms, das Methyl-FH_4 in FH_4 und Formaldehyd spaltet, reagiert Formaldehyd nicht-enzymatisch mit dem Amin weiter unter Bildung des Alkaloids in einer Pictet-Spengler Kondensation (ROSENGARTEN et al., 1975). Das verantwortliche Enzym für den Transfer der Einkohlenstoffeinheit von Methyl-FH_4 auf biogene Amine ist wahrscheinlich die 5,10-Methylen-FH_4-Reduktase (EC 1.1.99.15). Folglich tritt Methylen-FH_4 als enzymatisch gebildetes Zwischenprodukt dieser Transferreaktion auf (Abb. 4).

Demnach können weitere Reaktionen, die Methylen-FH_4 hervorbringen, die Synthese der ß-Carboline aus biogenen Aminen vermitteln. Eines dieser Enzyme ist die Serin-Hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1), welches die abgebildete Reaktion I katalysiert. Dieser mögliche Transfer einer Einkohlenstoffeinheit von Serin auf das biogene Amin Tryptamin und die anschließende Bildung des Alkaloids Tetrahydro-ß-Carbolin wird in einer Untersuchung von PEARSON & TURNER (1979) bestätigt. Es ist unwahrscheinlich, daß die Methylen-FH_4-Reduktase an der Synthese der ß-Carboline in vivo beteiligt ist. Unter physiologischen Bedingungen scheint der Reaktionsweg dieses Enzyms fast ausschließlich in Richtung der Methyl-FH_4-Synthese zu verlaufen. Demgegenüber katalysiert die Serin-Hydroxymethyltransferase hauptsächlich die umgekehrte Reaktion. Damit scheint sie an der ß-Carbolinsynthese in vivo teilzunehmen, und zwar in Gehirnregionen, die hohe Konzentrationen an Indolaminen oder Katecholaminen aufweisen.

Daneben sind auch andere Enzyme denkbar, die derselben Gruppe entstammen, z.B. die Transferasen, die bei der Purinbiosynthese

eine zentrale Rolle spielen (Phosphoribosylglycinamidformyltransferase, EC 2.1.2.2; Phosphoribosylaminoimidazolcarboxamidformyltransferase, EC 2.1.2.3). Wichtig ist auch die Thymidylatsynthetase (EC 2.1.1.45), die bei der Pyrimidinbiosynthese beteiligt ist (zur Übersicht siehe: RADER & HUENNEKENS, 1973).

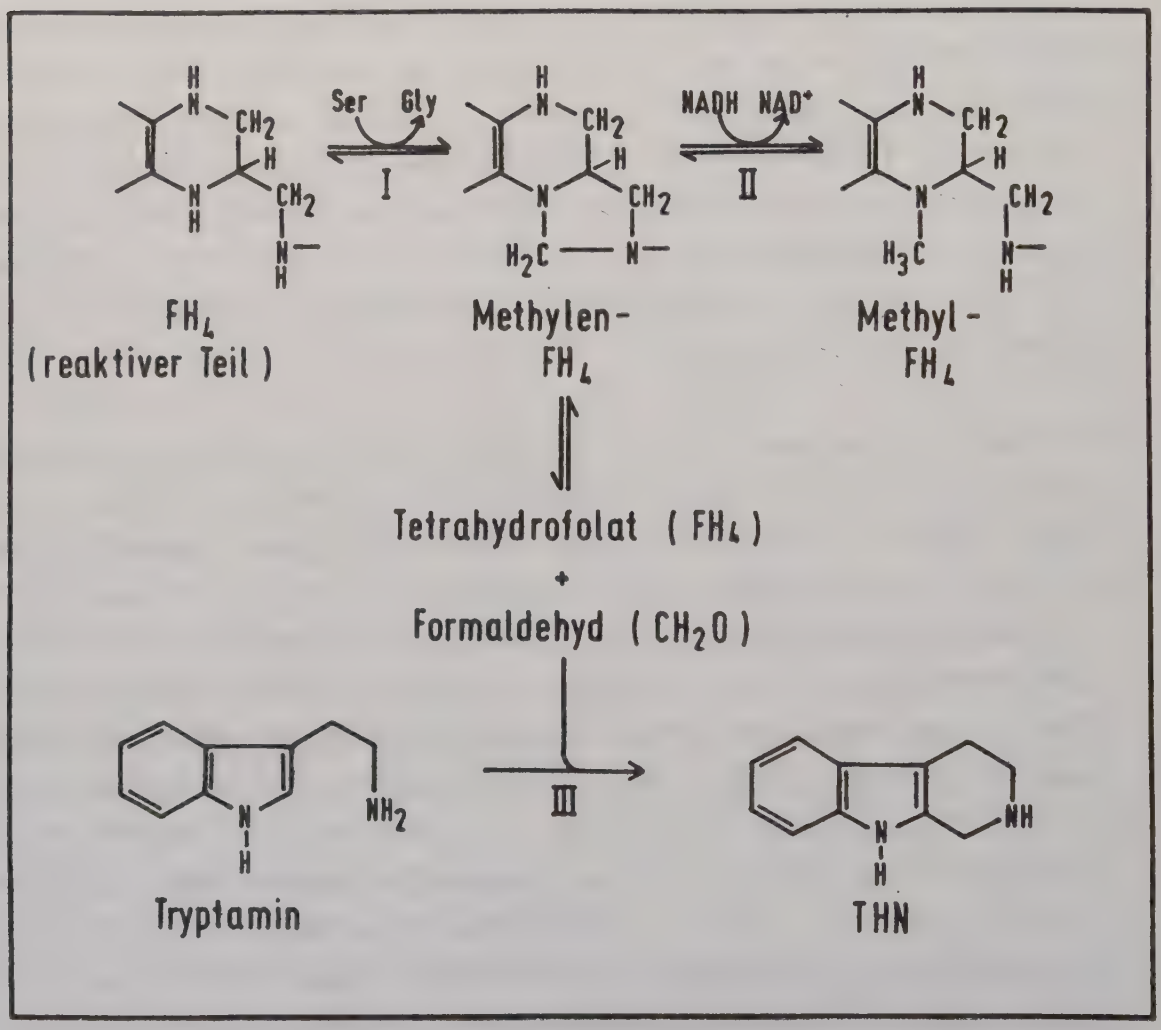


Abb. 4: Mögliche Rolle des 5,10-Methylentetrahydrofolat im Transfer von Einkohlenstoffeinheiten auf biogene Amine (nach PEARSON & TURNER, 1979).
Die beteiligten Enzyme sind:
I Serinhydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)
II Methylentetrahydrofolatreduktase (EC 1.1.99.15)
III Die Kondensation zur Bildung des Tetrahydro-ß-Carbolin ist wahrscheinlich nicht-enzymatisch.

Mit Extrakten aus den verschiedensten Geweben kann die ß-Carbolinbildung bestätigt werden. Die Arbeitsgruppe von MANDEL (1974) verwendet Hühnerherzen und Rattenhirn als Enzymquelle. Die Bildung von Tetrahydro-ß-Carbolin nach Inkubation mit Tryptamin wird an Rattenhirnfraktionen von HSU und MANDELL (1975) bestätigt. Außerdem finden sie bei der subzellulären Verteilung die weitaus höchsten Bildungsraten in der Cytosolfraktion. Auch regionale Unterschiede weisen sie nach; dabei hat das Striatum den größten Umsatz mit 210 $\pm$ 3,8 pmol THN/mg Protein/h. Während in Regionen mit relativ geringer 5-HT-Konzentration wie dem Großhirncortex oder mit hohem Anteil an weißer Substanz (Corpus callosum) die Enzymaktivität um zwei Drittel niedriger ist. BARCHAS und Mitarbeiter (1974) weisen die Bildung von Tetrahydro-ß-Carbolinen durch Inkubation von menschlichen Thrombozyten mit 5-MTHF und Tryptamin nach.

Die Arbeitsgruppe von WYATT (1975) weist die Zyklisierung von Indolen in vitro auch an menschlichem Gehirngewebe nach.

Im Mittelpunkt unserer Untersuchungen steht das Tetrahydronorharman (THN), das Kondensationsprodukt von Tryptamin mit Formaldehyd. Diese Verbindung und auch die in Position 6 hydroxylierte Verbindung (6-OH-THN) können im Säugetierorganismus vorkommen, da die Substrate physiologisch vorhanden sind und Formaldehyd äußerst reaktionsfähig ist (MARSDEN & CURZON, 1974; MARTIN et al., 1972; WESTERN & OZBURN, 1949). Der in vivo Nachweis von ß-Carbolinen im Urin von Ratten gelingt McISAAK (1961) nach Vorbehandlung mit dem MAO-Hemmstoff Iproniazid, Acetaldehyd und Disulfiram, ein Hemmstoff der Aldehyddehydrogenase und Dopamin-ß-hydroxylase. Diese Befunde werden von SAHEB und DAJANI (1973) bestätigt und von SHOEMAKER und Mitarbeitern (1978) ergänzt. Letztere bestrah-

len den Nucleus arcuatus in situ von Ratten mit einer Helium-Cadmium Laserquelle, wonach für ß-Carboline charakteristische Muster im Fluoreszenzemissionsspektrum auftreten. Unserer Arbeitsgruppe ist es mit Hilfe einer radiometrischen Methode gelungen, das aus Tryptamin und Formaldehyd entstandene ß-Carbolin, das Tetrahydronorharman (THN), im Gehirn von Ratten sowie den Thrombozyten und dem Urin von Menschen und Ratten ohne Vorbehandlung nachzuweisen (HONECKER und ROMMELSPACHER, 1978). In einer späteren Untersuchung konnte auch der Abkömmling des Serotonins (6-Hydroxy-tetrahydronorharman, 6-OH-THN) im Gehirn von Ratten sowie Thrombozyten und Urin von Menschen ohne Vorbehandlung nachgewiesen werden (ROMMELSPACHER et al., 1979). Diese Befunde werden inzwischen für das Rattengehirn (BARKER et al., 1979) und menschliche Thrombozyten bestätigt (KARI et al., 1979). Allerdings variiert nach unseren Ergebnissen die Menge an THN, die im Morgenurin ausgeschieden wird, stark. Möglicherweise ist dieser Unterschied abhängig von der Diät, zumal Belastung mit 4 g Tryptophan zu einem etwa 40fachen Anstieg von THN im Urin führt. Dagegen wird der THN-Gehalt durch ausschließlichen Genuß von Mineralwasser erheblich vermindert. Andererseits wird exogen zugeführtes THN (Verhältnis Blut zu Gehirn 1:3) in Neurone möglicherweise aktiv aufgenommen, da in einer Synaptosomen-reichen Hirnfraktion ^{14}C-THN etwa 30fach angereichert wird. Die bisher gewonnenen Befunde über die Bildung und den Metabolismus von THN sind in Abbildung 5 dargestellt.

Es stellt sich weiter die Frage nach der biologischen Aktivität dieser Substanzen, die in der neuropsychiatrischen Forschung zu neuen Erkenntnissen führen könnte. Aufgrund der chemischen Struktur von THN liegt es nahe, serotonerge Eigenschaften in vivo zu vermuten. Diese Hypothese wird mit verschiedenen pharmakologischen Tests überprüft, bei denen be-

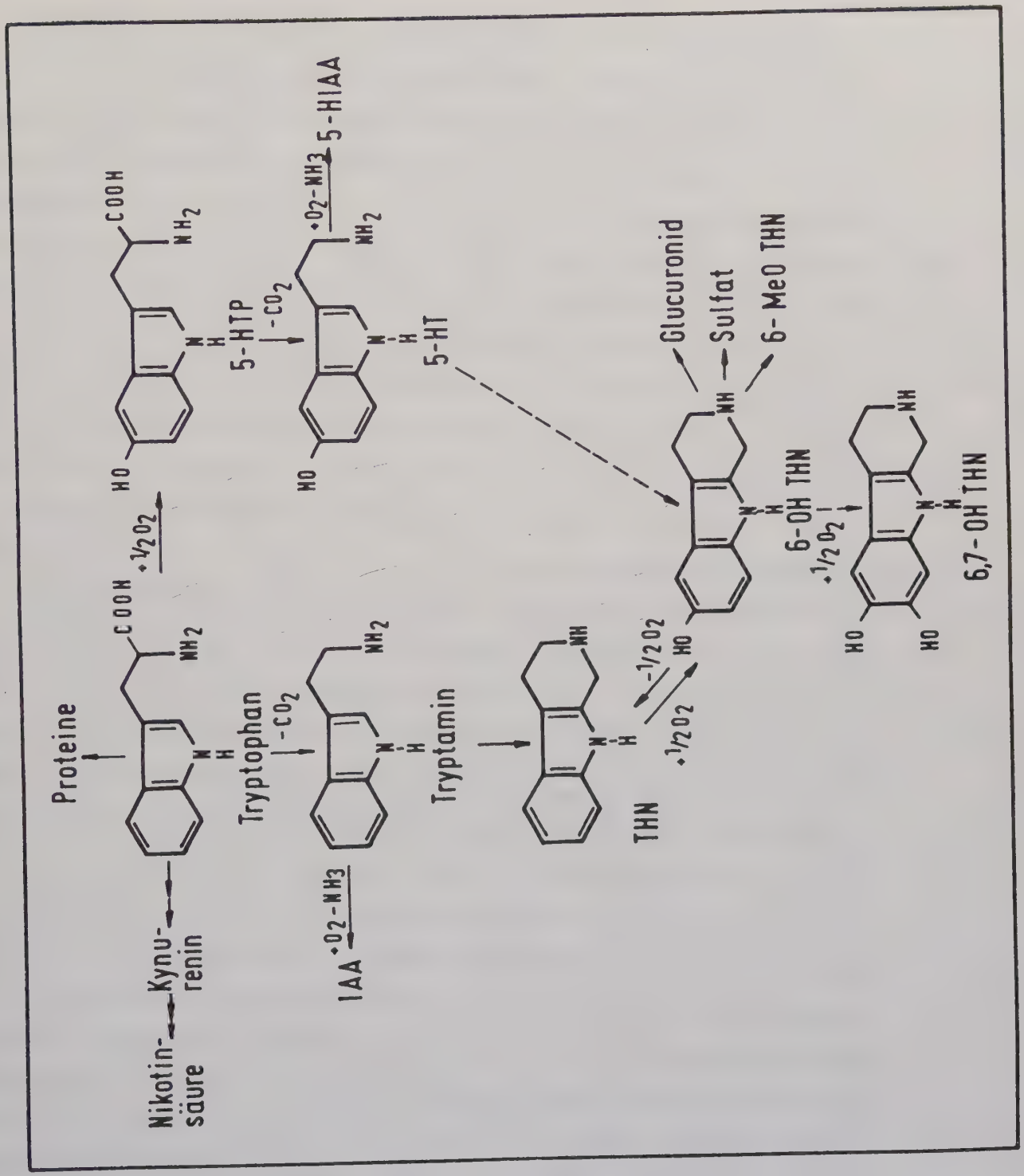


Abb. 5: Bildung und Metabolismus von THN nach bisher gewonnenen Befunden mit durchgezogenem Pfeil. Reaktionsschritte, die nur vermutet werden, sind mit gestricheltem Pfeil gekennzeichnet (ROMMELSPACHER, 1978).

kannte serotonerg- bzw. dopaminerg-wirkende Substanzen spezifische Änderungen hervorrufen (ROMMELSPACHER et al., 1977). In diesen pharmakologischen Experimenten wirkt THN entsprechend Serotonin-ähnlichen Substanzen. Untersucht wird der Einfluß auf die Körpertemperatur, Grobmotorik, Flüssigkeits- und Nahrungsmittelaufnahme im chronischen Versuch. Außerdem wird eine Beteiligung serotonerger Neurone bei der Schmerzempfindung angenommen. Dabei senkt p-Chlorophenylalanin (p-CPA) die Serotoninkonzentration im ZNS und verstärkt die Sensibilität gegenüber Schmerzstimuli. Dies soll mit einer verminderten Stimulierung serotonerger Rezeptoren einhergehen. Dieser p-CPA-Effekt kann durch Injektion von 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) wieder aufgehoben werden (HARVEY et al., 1974). Umgekehrt ist zu erwarten, daß eine verstärkte Stimulierung serotonerger Rezeptoren zu einer abgeschwächten Schmerzempfindung führt. Tatsächlich hat THN in verschiedenen von uns durchgeführten Tests einen analgetischen Effekt, der verglichen mit Morphin allerdings 10fach schwächer ist. Ein relativ spezifischer Test für serotonerg-wirkende Substanzen beruht auf der Beobachtung, daß Indole vor allem in Kombination mit Hemmstoffen der Monoaminoxidase ein Hyperaktivitätssyndrom auslösen (JACOBS, 1976; GRAHAME-SMITH, 1971). In diesem Verhaltenstest löst THN dosisabhängig die gleichen Symptome aus wie 5-Hydroxytryptophan, nach Vorbehandlung mit dem peripheren Decarboxylase-Hemmer Benserazid (RO 4-4602). Nach neurotoxischer (p-CPA) beziehungsweise thermolytischer Ausschaltung präsynaptischer, serotonerger Neurone (Läsion der Raphé-Kerne) ist der THN-Effekt abgeschwächt beziehungsweise fast vollständig blockiert (PANNIER und ROMMELSPACHER, 1978; PANNIER, 1979). Alle Ergebnisse sprechen für eine Serotonin-ähnliche Wirkung des THN. Darüberhinaus stellt sich im pharmakologischen Experiment heraus, daß THN eine antidopaminerge Wirkung hat, obgleich zunächst aufgrund der che-

mischen Struktur des THN angenommen wurde, daß die Substanz dopaminerge Neurone nicht beeinflußt. Die chemische Ausschaltung mit 6-Hydroxydopamin (6-OH-DA) führt zu einer deutlichen Verlängerung der durch Apomorphin induzierbaren Leckbewegungen. THN hemmt sie dosisabhängig.

Nach thermischer Zerstörung der dopaminergen Neurone der nigro-striatalen Bahn auf einer Seite können ebenfalls postsynaptische Effekte untersucht werden. Apomorphin provoziert bei derartig vorbehandelten Tieren kontralaterales Zwangsdrehen. Auch in diesem Test wirkt THN dosisabhängig antagonistisch. Es liegt also nahe, daß THN bei dopaminergen Neuronen einen postsynaptischen Angriffspunkt hat (PANNIER und ROMMELSPACHER, 1981; ROMMELSPACHER et al., 1977; ROMMELSPACHER et al., 1979).

Da Tryptamin sehr wahrscheinlich in dopaminergen Neuronen als Decarboxylierungsprodukt des Tryptophans vorkommt, könnte THN möglicherweise auch die Effekte von Dopamin modulieren. Besonders unter Berücksichtigung der Wirkungsweise von Neuroleptika (CROW et al., 1976; van PRAAG, 1979) würden sich dann interessante Perspektiven eröffnen, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht diskutiert werden soll.

B. PROBLEMSTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Chemische Struktur und pharmakologische Experimente sprechen dafür, daß bevorzugt serotonerge Neurone durch THN beeinflußt werden. Zunächst wurde von unserer Arbeitsgruppe die spezifische Wiederaufnahme von Serotonin in Synaptosomen untersucht (ROMMELSPACHER et al., 1977). In einer mit Synaptosomen angereicherten Fraktion aus Rattenhirn hemmt THN den Membrantransport von ^{3}H-Serotonin kompetitiv bei einer Hemmkonstanten (K_i) von 6,1 x 10^{-6} mol/l. Das Ergebnis spricht für einen serotonergen Effekt von THN über eine verlängerte Wirkung des Transmitters am Rezeptor.

BUCKHOLTZ und BOGGAN (1976) bestätigen den Einfluß von ß-Carbolinen auf die Serotonin-Aufnahme in Synaptosomen aus Mäusegehirn. Dabei liegt die Affinität von THN für die spezifische Wiederaufnahme in der gleichen Größenordnung wie bei der Ratte. Außerdem beobachten die Autoren bei entsprechenden Untersuchungen am Rattenhirn, daß ß-Carboline den Transport von Noradrenalin und Dopamin weniger hemmen als den von Serotonin (BUCKHOLTZ und BOGGAN, 1977a). Diese an verschiedenen Transportsystemen erhobenen Befunde stützen die Hypothese, daß THN als Modulator serotonerger Neurone wirkt. Damit wäre eine neue Klasse zum Teil endogener Inhibitoren gefunden, die möglicherweise antidepressive Eigenschaften besitzen und zum Verständnis der Pathogenese psychischer Erkrankungen beitragen könnten.

Ein weiterer Mechanismus, die Funktion der Überträgersubstanz zu unterstützen, ist die Abbauhemmung. Auch in dieser Hinsicht wirken ß-Carboline bei neurochemischer Prüfung wie Antidepressiva (MAO-Hemmstoffe). Die inhibitorische Wirkung der ß-Carboline auf die Aktivität der MAO (EC 1.4.3.4) wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen beobachtet (McISAAC et al.,1966; HO et al

1968; BURKARD und KETTLER, 1977). Von unserer Arbeitsgruppe konnte ein indirekter Nachweis der MAO-Hemmung erbracht werden. Nach intraperitonealer Injektion von 25 mg/kg THN stieg die Serotoninkonzentration im Hirnstamm signifikant an. Dagegen war die Menge des Abbauprodukts, der 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) deutlich vermindert (ROMMELSPACHER, 1978).

Ein weiterer möglicher Wirkmechanismus des THN, den es zu prüfen galt, war die direkte Stimulierung postsynaptischer Rezeptoren. Dazu wurden mittels chemischer (Synthesehemmstoff p-CPA) beziehungsweise thermischer (Ausschaltung der Raphé-Kerne) Vorbehandlung die präsynaptischen Anteile der Neurone ausgeschaltet. Anschließend ließ sich die THN-Wirkung am postsynaptischen Rezeptor unter in vivo Bedingungen beurteilen. Mit beiden Methoden fand sich eine deutliche Rechtsverschiebung im Hyperaktivitätstest. Allerdings führten niedrige Konzentrationen von p-CPA zu einer Linksverschiebung, was als Übererregbarkeit postsynaptischer Rezeptoren interpretiert werden könnte. Die Serotonin-ähnlichen Effekte von THN dürften vorwiegend aber nicht ausschließlich präsynaptisch lokalisiert sein (PANNIER und ROMMELSPACHER, 1981).

Im Rahmen eines Gesamtkonzeptes des THN-Wirkungsmechanismus lassen sich diese Befunde erst beurteilen, wenn der Einfluß von THN auf die Ausschüttung des Transmitters bekannt ist. Der Serotonin-agonistische Effekt könnte auch über die vermehrte Ausschüttung von Serotonin erfolgen. Diese gesteigerte Ausschüttung des Transmitters könnte mit ein Grund sein für die beobachtete Hemmung der spezifischen Wiederaufnahme, weil nur der radioaktiv-markierte Transmitter gemessen wird. Dadurch könnte eine vermehrte Ausschüttung in den synaptischen Spalt eine Hemmung der Wiederaufnahme vortäuschen. In zahlreichen Untersuchungen, die die Wirkung verschiedener

Substanzen auf die Hemmung der spezifischen Wiederaufnahme bzw. die Auslösung der spezifischen Ausschüttung zum Gegenstand hatten, trat das Problem auf, zwischen diesen unterschiedlichen Wirkungen zu unterscheiden, wenn sie gleichzeitig auftreten (HEIKKILA et al., 1975). In unseren Experimenten versuchten wir mit Hilfe der Superfusionstechnik sowie durch Anwesenheit eines spezifischen Hemmstoffes der Wiederaufnahme unsere Beobachtungen auf die spezifische Ausschüttung zu beschränken. Die funktionelle Bedeutung unserer Ergebnisse könnte darin liegen, daß THN als Modulator serotonerger Neurone wirkt. Diese Fragestellung soll in den folgender Untersuchungen behandelt werden.

Darüberhinaus stellt sich die Frage, ob THN selbst ein mutmaßlicher Transmitter ist. Einige Voraussetzungen für diese Hypothese konnten bereits nachgewiesen werden; so z.B. der in vivo Nachweis der Ausgangssubstanzen und eines synthetisierenden Enzyms. MARSDEN und CURZON (1974) konnten eine Vorstufe, das Tryptamin, im Rattenhirn mit 35 ng/g Feuchtgewicht bestimmen. Außerdem kommt THN im Gehirn der Ratte sowie den Thrombozyten und dem Urin von Ratte und Mensch vor. Die Substanz ist pharmakodynamisch aktiv und wird metabolisiert (ROMMELSPACHER und GREINER, 1978). Weiterhin ist zu fragen, ob THN selbst durch Stimulierung spezifisch ausgeschüttet wird und ob Vorbehandlung mit Reserpin die THN-Ausschüttung beeinflußt. Die Möglichkeit, daß THN als falscher Transmitter wirkt, wie es für Tetrahydroisochinoline bei katecholaminergen Neuronen postuliert wurde, soll anhand der Ergebnisse diskutiert werden (MYTILINEOU et al., 1974). Aus diesen Überlegungen ergaben sich folgende Arbeitshypothesen und Fragestellungen:

1. Erfolgt die Wirkung von THN über eine vermehrte Ausschüttung von 5-HT?

a) Ist die spezifische 5-HT-Ausschüttung durch Depolarisation (hohe Kaliumkonzentration) auslösbar und durch THN stimulierbar?
b) Ist dieser THN-Effekt im Sinne eines Membrantransports Calcium-abhängig?
c) Verhindert die Vorbehandlung mit Reserpin, ein Hemmstoff des vesikulären Speichermechanismus, die spezifische Ausschüttung?

2. Wirkt THN selbst als möglicher Transmitter?
   a) Ist die spezifische Ausschüttung der Substanz mit Kalium-Depolarisation stimulierbar?
   b) Ist die spezifische Ausschüttung Calcium-abhängig?
   c) Verhindert die Vorbehandlung mit Reserpin die spezifische Ausschüttung?

3. Ist eine Koexistenz von Serotonin und THN in den Vesikeln möglich?
   a) Ist die spezifische Ausschüttung beider Substanzen durch Kalium-Depolarisation stimulierbar?
   b) Wird die spezifische Ausschüttung von Serotonin durch ansteigende THN-Konzentrationen moduliert und vice versa?

Diese Fragen wurden unter Anwendung der Superfusionstechnik bearbeitet. Mit Hilfe dieser Methode wurde der Ausstrom von exogenem Tritium-Serotonin und ^{14}C-THN bestimmt. Die ausführliche Darstellung der Methode erfolgt später (siehe Seite 23). Alle Experimente wurden an Hirnschnitten aus dem Hypothalamus von weiblichen Wistar-Ratten ausgeführt.

C. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

C.I. MATERIAL

C.I.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche Albinoratten des Stammes Wistar (250 - 280 g), die von der Firma Hoffmann, Berlin, bezogen wurden. Es wurden jeweils 10 bis 15 Tiere in einem Käfig unter natürlichen Lichtbedingungen gehalten, wobei sie Futter (Altromin R 10, Firma Altrogge, Lage-Lippe) und Leitungswasser ad libitum erhielten.

C.I.2. Chemikalien

C.I.2.a Verabreichte Pharmaka

RESERPIN: Diese Substanz ist ein Alkaloid aus Rauvolfia serpentina mit folgender Strukturformel:

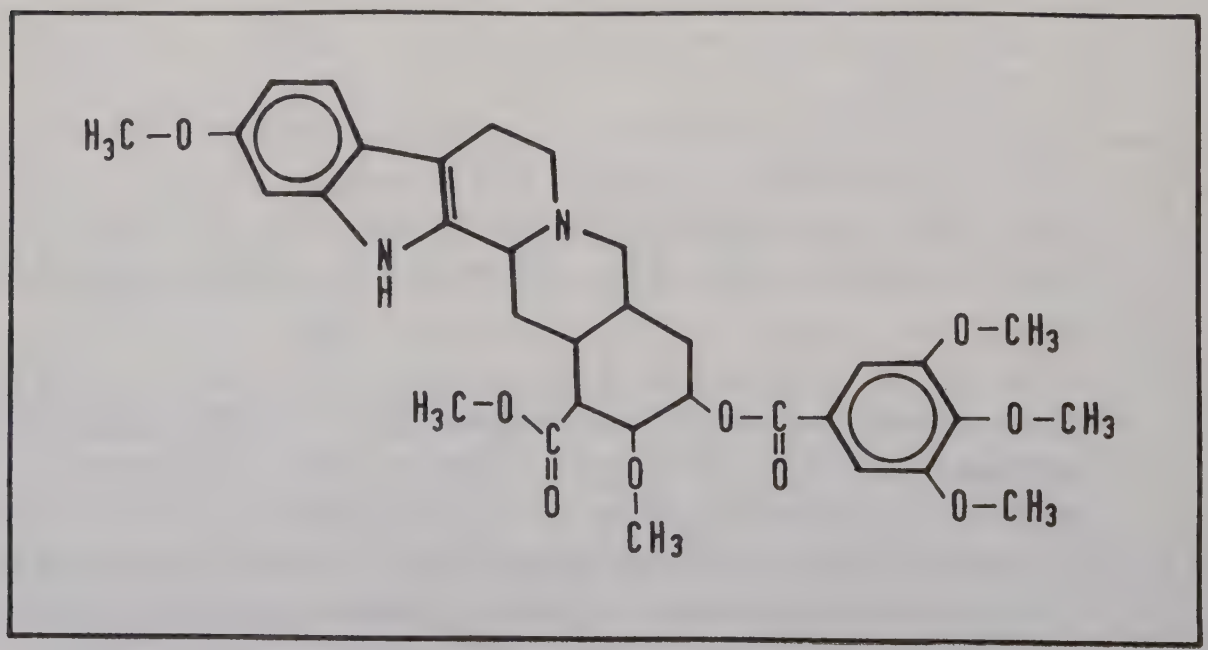


Abb. 6: Reserpin (z.B. Serpasil^{R})

Seine Hauptwirkung besteht in der Herabsetzung des Gehaltes an Transmittern in peripheren und zentralen Neuronen. Auf die Abnahme des Gehalts an Noradrenalin, Dopamin und Serotonin im ZNS wird die ausgeprägte sedative Wirkung von Reserpin zurückgeführt. Die Wirkung beruht, nach Aufnahme in die Varikositäten und Anreicherung in den Vesikelmembranen, auf einer Hemmung des aktiven Transports des Transmitters in die Vesikel. Über diese Hemmung des vesikulären Speichermechanismus hinaus führen hohe Dosen zu einer irreversiblen Schädigung der Vesikel (CARLSSON, 1966).
Reserpin (Serpasil^{R}) wurde von der Firma Ciba Geigy, Wehr/Baden, bezogen. Das Originalmedikament wurde den Tieren verabreicht.

C.I.2.b. Sonstige Chemikalien

^{14}C-THN und unmarkiertes THN wurden nach der Synthesevorschrift von VEJDĚLEK und Mitarbeitern (1961) aus Tryptamin und Glyoxylsäure als Vorstufen hergestellt. Die Identität und Reinheit der Substanzen wurde durch Schmelzpunktbestimmung (287 - 288°C), vergleichende dünnschichtchromatographische Analyse sowie spektrale Untersuchungen des Infrarot- und Massenspektrums und Elementaranalyse sichergestellt.
Gekauft wurde ^{14}C-Glyoxylsäure (spezifische Radioaktivität 2 bis 10 mCi/mmol von Amersham-Buchler, Braunschweig. Die spezifische Radioaktivität von ^{14}C-THN betrug 0,24 mCi/mmol.

^{3}H-Serotonin (spezifische Radioaktivität 500 mCi/mmol) wurde vom Radiochemical Center, Amersham/England, bezogen. Serotonin-Kreatininsulfat von E. Merck, Darmstadt, und CGP 6085/A (4-(5,6-dimethyl-2-benzofuranyl)-piperidinhydrochlorid) von Ciba Geigy, Wehr/Baden.

Alle für den Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer verwendeten Substanzen wurden von Merck bezogen und waren von p.a.-Qualität.

Protosol^{R}. tissue and gel solubilizer sowie Aquasol^{R}-2, Universal L.S.C. Cocktail, stammten von New England Nuclear (NEN) Boston/Mass.

C.I.3. Geräte

Zum Superfusionssystem gehörten:
- Schüttler MS (D.B.P. 11.7), Köttermann KG, Hämigsen
- Wasserbad R 20, Haake
- Pumpe 375A, Sage Instruments, Division of Orion Research Incorporated

sonstige Geräte:
- Scintillationszähler 3380, Packard.

C.II. BEHANDLUNG DER TIERE

Reserpin wurde den Ratten in einer Gesamtdosis von 7,5 mg/kg Körpergewicht i.p. appliziert. In einer ersten Dosis wurden 5 mg/kg 18 Stunden vor Versuchsbeginn und in einer zweiten Dosis nach 16 1/2 Stunden 2,5 mg/kg verabreicht. Die Tötung der Tiere erfolgte 1 1/2 Stunden nach der letzten Verabreichung des Pharmakons durch Dekapitation. Zu diesem Zeitpunkt waren an den Ratten Katalepsie, Rigor und Intentionszittern zu beobachten (HOLZ & COYLE, 1974). Das Gesamtgehirn wurde schnell herauspräpariert.

C.III. PRÄPARATION DER GEHIRNE

Das Gesamtgehirn wurde auf einer eisgekühlten Petrischale sofort weiterpräpariert (GLOWINSKI & IVERSEN, 1966). Es wurde aus dem Zwischenhirn der gut abgrenzbare Hypothalamus freigelegt (schraffiert, Abb. 7). Bei der Entnahme des Gehirns blieb die Hypophyse im knöchernen Schädel zurück, und das Infundibulum wurde in der Regel dadurch abgerissen. Ein schmaler Spalt blieb erkennbar, der sich nach dorsal zum dritten Ventrikel hin öffnete. Dieser Spalt war von einer kleinen Erhöhung aus grauer Substanz umgeben, dem Tuber cinereum, das cranial durch das Chiasma opticum begrenzt wurde und caudal kontinuierlich in die Corpora mamillaria überging, welches deutlich über der Fossa interpeduncularis erhaben war. Letztere trennte zwei dicke divergierende Bänder, die Pedunculi cerebri.

Aus dem Hypothalamus (Feuchtgewicht 30 - 35 mg) wurden Gewebestücke präpariert, die eine Dimension von ungefähr 1 mm^3 hatten. Die Auswahl dieser Hirnregion beruht auf ihrer vergleichsweise hohen Anzahl serotonerger Nervenendigungen (PATON, 1958; IVERSEN, 1970a; PAGE & CARLSSON, 1970; GREEN et al., 1973).

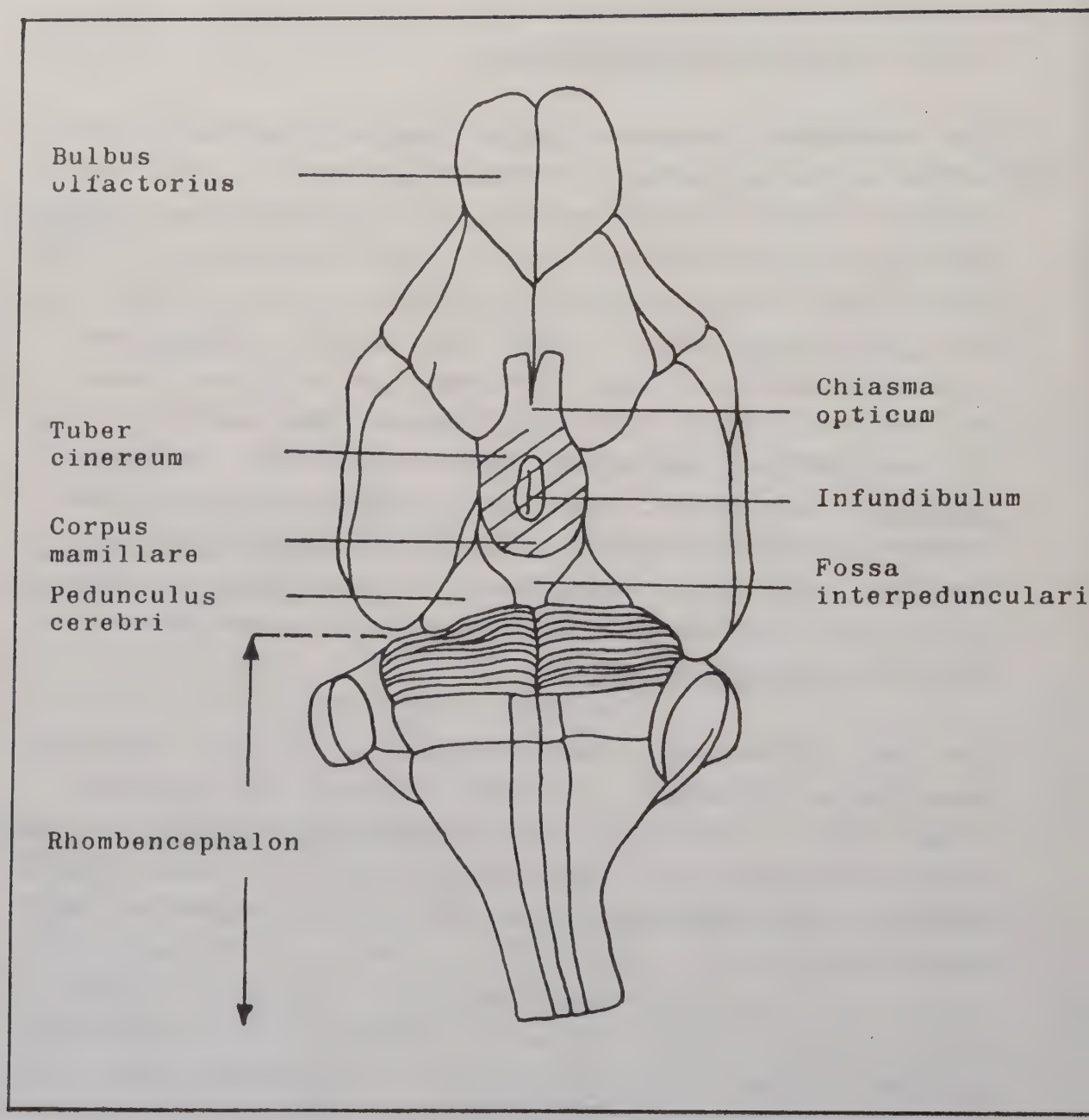


Abb. 7: Rattenhirn, ventrale Ansicht ohne Hypophyse und Hirnnerven (Zeichnung nach ZEMAN & MAITLAND-INNES, 1963, verändert)

C.IV. BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN AUSSCHÜTTUNG VON ^{3}H-SEROTONIN UND ^{14}C-THN MIT HILFE DER SUPERFUSIONS-TECHNIK

C.IV.1. Darstellung des Superfusionssystems

In früheren Versuchen wurde im Medium, nach der Trennung vom Gewebe und vorausgegangener Inkubation, die freigesetzte Radioaktivität bestimmt (NG et al., 1971; COLBURN & KOPIN, 1972; BOURGOIN et al., 1977). Ein Nachteil dieser Methode war, daß während der eingeschalteten Wasch- und Resuspensionsschritte Radioaktivität verlorenging. Außerdem wurde mit diesem Vorgehen die Wiederaufnahme des zuvor freigesetzten Substrats nicht verhindert.

Demgegenüber hatte die von uns angewandte Superfusionsmethode den Vorteil, daß mit Hilfe einer einfachen Apparatur eine genaue und kontinuierliche Messung des freigesetzten Substrats möglich war. Dabei konnten kleine Synapsen-reiche Proben simultan behandelt werden (RAITERI et al., 1974; MULDER et al., 1975; SUBRAMANIAN & MULDER, 1977; STARKE et al., 1978; ROMMELSPACHER & SUBRAMANIAN, 1979). Synaptosomen und Gewebeschnitte wurden bisher häufig als Modell benutzt, um die Speicherung und die spezifische Ausschüttung und Wiederaufnahme von Transmittern in vitro zu untersuchen. Zudem ließ sich der Einfluß von Drogen und anderen Agentien auf diese Prozesse analysieren (SNYDER et al., 1970; IVERSEN & JOHNSTON, 1971; WHITTAKER, 1972 und 1973; ANDREWS et al., 1978). Um die spezifische Ausschüttung von Transmittern zu untersuchen, wurde die Gewebeschnitte mit radioaktiv markierten Substanzen, wie ^{3}H-5-HT und ^{14}C-THN, beladen. Nach der Inkubation wurden die Gewebeschnitte in eine Superfusionskammer gebracht und mit hohen Kaliumkonzentrationen depolarisiert. Die dabei ins

fließende Medium freigesetzte Radioaktivität wurde sofort weitertransportiert und in den gesammelten Proben gemessen.

Die Apparatur (Abb. 8) bestand aus vier Superfusionskammern (3) mit einem Volumen von je 0,5 ml. Sie waren von einem temperierten Wassermantel (4) umgeben. Das auf 37°C eingestellte Wasser hielt eine daran angeschlossene Pumpe (5) in Umlauf. Während der Superfusion stand der Boden der Kammern über ein Schlauchsystem mit den zugeführten Lösungen in Verbindung. Sämtliche Lösungen standen in einem Wasserbad (1) bei 37°C und wurden mit einem Gasgemisch (95 % O_2 / 5 % CO_2) gesättigt. Eine zwischengeschaltete peristaltische Pumpe (2) sicherte eine Durchflußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Am Ende des Systems wurde die Lösung direkt in Szintillationsfläschchen (6) aufgefangen.

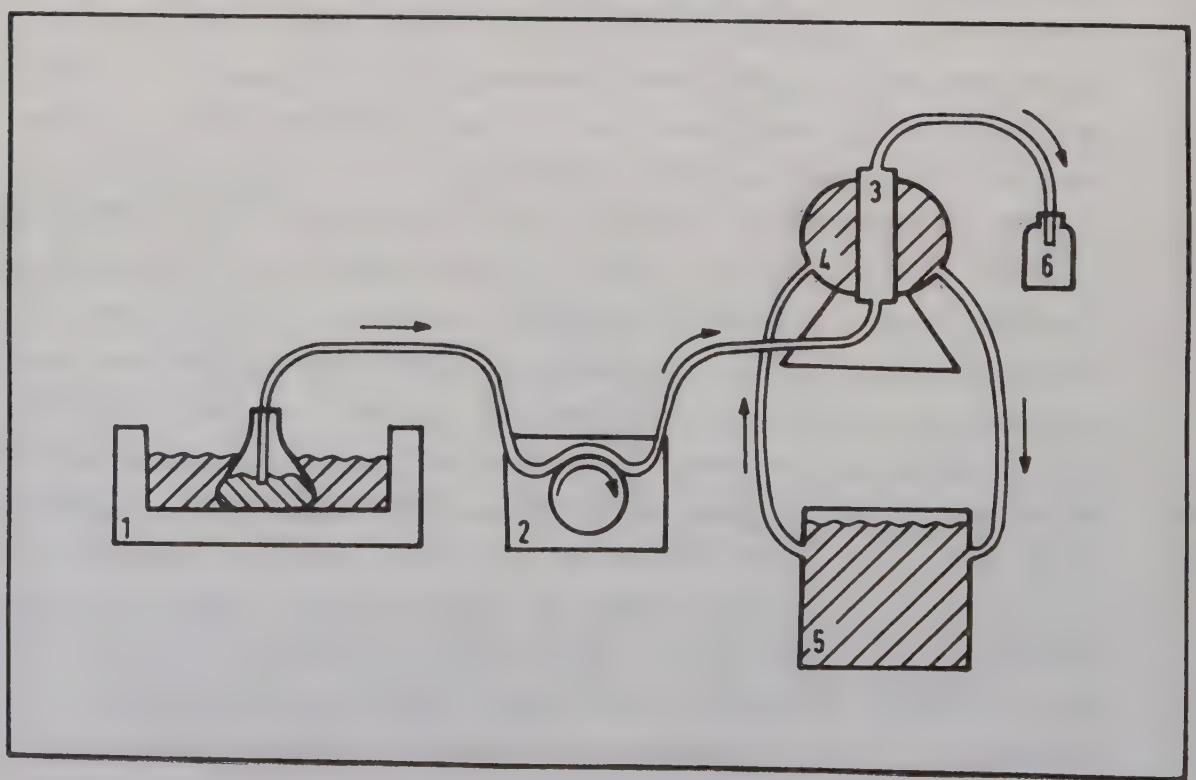


Abb. 8: Schematische Darstellung der Superfusionsapparatur, Erklärung im Text

Die Superfusion wurde in Krebs Ringer Bikarbonat-Puffer ausgeführt, der folgende Zusammensetzung in mM hatte: NaCl 118; KCl 4,85; $CaCl_2$ 2,54; $MgSO_4$ 1,15; KH_2PO_4 1,15; $NaHCO_3$ 25 und Glucose 7,57. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 0,1 N HCl auf 7,35 eingestellt. Neben dieser Stammlösung kamen zur Anwendung: eine Calcium-freie Lösung, die dem oben beschriebenen KRB-Puffer entsprach unter Weglassen von $CaCl_2$ 2,54 mM, und eine Lösung mit erhöhter Kaliumkonzentration auf 30 mM KCl statt 4,85 mM. Zur Erhaltung der Isoosmolarität des Mediums wurde die Konzentration von NaCl auf 92,9 mM gesenkt. Im übrigen entsprach die Zusammensetzung der oben beschriebenen. Die Lösungen wurden jeweils vor Versuchsbeginn aus vier Stammlösungen unter Zugabe der Glucose hergestellt.

C.IV.2. Beschreibung des experimentellen Verfahrens

Die Experimente wurden alle, soweit nicht anders angegeben, wie folgt durchgeführt. Die von zwei Hypothalami präparierten Gewebeschnitte wurden mit radioaktiv markiertem Serotonin beziehungsweise THN in 2 ml KRB-Puffer für 10 bzw. 20 Min. inkubiert. Während dieser Zeit wurde der Inkubationsansatz in einem Wasserbad von 37°C und bei Luftatmosphäre geschüttelt. Danach wurde der Überstand des Inkubationsmediums abgesaugt und verworfen und die Gewebestücke wurden mit 2 ml KRB-Puffer gewaschen. Anschließend wurden jeweils vier Gewebestücke in eine Superfusionskammer überführt und die Superfusion mit KRB-Puffer begonnen. Während der ersten 20 Minuten stabilisierte sich der Tritum- und ^{14}C-Ausstrom, so daß die Verlustrate pro Fraktion annähernd konstant wurde. Nach dieser Equilibrierungsperiode wurde das Superfusionsmedium alle 2 Min. fraktioniert aufgefangen über einen Zeitraum von 44 Minuten. Eine Depolarisation wurde durch Erhöhung der Kaliumkonzentra-

tion von insgesamt 6 auf 31 mM ausgelöst. Diese Stimulationsphasen dauerten 5 Minuten und wurden nach 8 (S_1) und nach 28 Minuten (S_2) durchgeführt (siehe Abszisse, Abb. 9). Während der Stimulationsphase wurde dem Superfusionsmedium CGP 6085/A (3×10^{-8} mol/l), ein Hemmstoff der spezifischen Wiederaufnahme von Serotonin, zugesetzt. In einem Referenzkanal wurde der spontane Ausstrom an Radioaktivität in Gegenwart von CGP 6085/A untersucht, ohne die Kaliumkonzentration zu erhöhen. Nach der Sammelperiode wurden die Gewebestücke einer Kammer in jeweils ein Szintillationsglas überführt und in 1 ml Protosol^R 1 - 1 1/2 Stunden bei 45°C geschüttelt. Im Anschluß wurde die Lösung mit 10 ml Aquasol^R-2 versetzt, wie auch die übrigen Proben der Sammelperiode. Abschließend wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler die Radioaktivität in cpm bestimmt

Die Ergebnisse werden in einem Koordinatensystem (Abb. 9) dargestellt. Die Abszisse stellt die Superfusionszeit bis zur 44. Minute dar, auf der Ordinate wird die freigesetzte Radioaktivität pro Fraktion abgetragen, relativ in % zur Gesamtradioaktivität zu diesem Zeitpunkt. Dieser Wert ist direkt nicht zu ermitteln, weil die Messung der Radioaktivität des Gewebes zu einer irreversiblen Schädigung führt. Man wählt daher ein retrogrades Berechnungsverfahren, d.h. man ermittelt die gesamt verbliebene Radioaktivität des Gewebes nach der Superfusion und addiert rückwärts bis zum Zeitpunkt 0 die jeweils pro Fraktion ermittelten Mengen an Radioaktivitätsverlust. Somit läßt sich der Gesamtwert an Radioaktivität jeweils zu Fraktionsbeginn errechnen, und man kann darauf die freigesetzte Menge beziehen, um Relativwerte zu erhalten.

Da es sich um relative Veränderungen handelt, wird zur Mittelwertbildung der Fraktionen das geometrische Mittel und nicht das arithmetische Mittel berechnet. Für Wachstumsprozesse - oder wie hier für Verlustprozesse - ist für die Ermittlung der durchschnittlichen Veränderungsrate grundsätzlich das geometrische Mittel anzuwenden. Dies gilt auch, wie sich zeigen läßt, wenn mehrere Raten der Radioaktivitätsfreisetzung gemittelt und über die Gleichung $t/? = \ln?/k$ zu durchschnittlichen Halbwertzeiten in Bezug gebracht werden sollen.

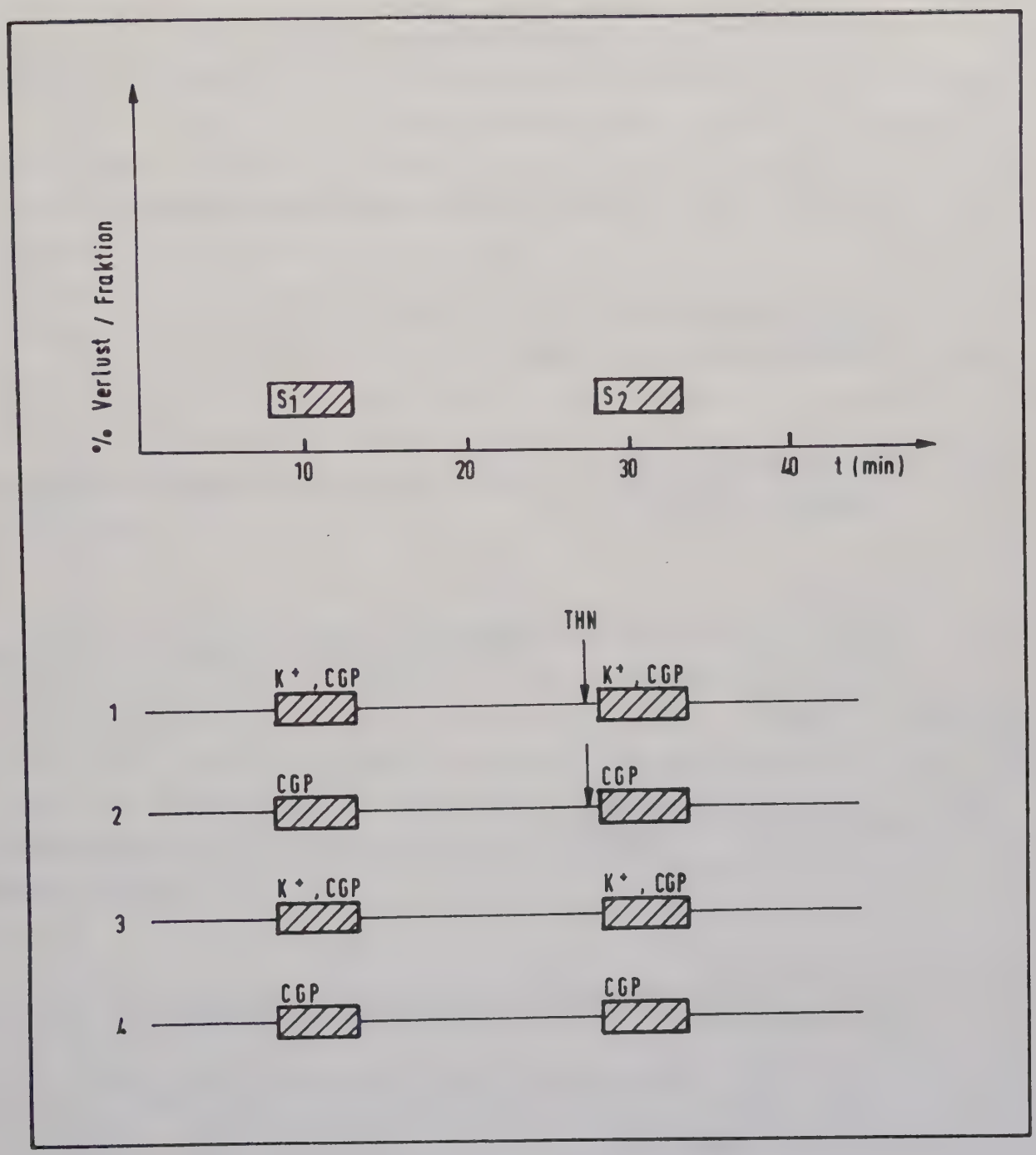


Abb. 9: Darstellungshinweise der Ergebnisse und Versuchsbedingungen in 4 Superfusionskammern (Erklärung im Text)

Schema der Versuchsführung:

Inkubation der Gewebestücke mit Tritium-Serotonin bzw. ^{14}C-THN in 2 ml KRB-Puffer bei 37°C 10 bzw. 20 Minuten schütteln

↓

Waschen der Gewebestücke mit 2 ml KRB-Puffer

↓

Je 4 Gewebestücke auf 4 Superfusionskammern ad 0,5 ml Kammervolumen verteilen

↓

Waschperiode von 20 Minuten in der Superfusionskammer mit oxygeniertem KRB-Puffer

↓

Sammelperiode von 44 Minuten bei einer Durchflußrate des Superfusionsmediums von 0,5 ml/min; Fraktionen von jeweils 2 Minuten

↙ ↘

Gewebestücke je Kammer
+ 1 ml Protosol^{R}

↓

1 - 1 1/2 Std. bei 45°C
im Schüttler

↓

+ 10 ml Aquasol^{R}-2

↓

Bestimmung der Radioaktivität im Szintillationszähler

je 1 ml Fraktion
+ 10 ml Aquasol^{R}-2

↓

C.IV.2.a. Inkubation mit ^{3}H-Serotonin

Bereits in vorausgehenden Experimenten (ROMMELSPACHER & SUBRAMANIAN 1979) konnte die spezifische Ausschüttung von ^{3}H-5-HT im Superfusionsmedium bestimmt werden. In Anlehnung an diese Versuche wurden die Hirnschnitte mit 2,5 x 10^{-7} mol/l ^{3}H-5-HT im Inkubationsansatz 10 Minuten markiert. Die Weiterbehandlung erfolgte wie oben beschrieben. Während der Sammelperiode (Abb. 9) wurden die Gewebestücke zunächst auf Stimulationsfähigkeit (S_1) untersucht. Nach insgesamt 27minütiger Superfusion (Pfeil) wurde der Einfluß von THN auf den Ausstrom von ^{3}H-5-HT geprüft (1 und 2). Dazu wurde THN bis zum Ende der Sammelperiode in jeweils ansteigenden Konzentrationen dem KRB-Puffer zugesetzt. In Referenzkanälen erfolgte die THN-Zugabe ohne eine zweite Depolarisation (S_2) sowie die zweite Depolarisation in Abwesenheit von THN (2 und 3). Der basale Ausstrom wurde ohne Depolarisation in Anwesenheit von CGP 6085/A gemessen (4).

C.IV.2.b. Inkubation mit ^{14}C-THN

Die Gewebestücke wurden mit 1,5 x 10^{-4} mol/l ^{14}C-THN 20 Minuten markiert unter im übrigen unveränderten Versuchsbedingungen. Während der Sammelperiode wurde, wie bereits beschrieben, zweimal mit erhöhter Kaliumkonzentration stimuliert ohne Zugabe von unmarkiertem THN.

C.IV.2.c. Doppelmarkierung mit ^{3}H-Serotonin und ^{14}C-THN

Die Gewebeschnitte wurden bei gleichzeitiger Anwesenheit von ^{3}H-5-HT und ^{14}C-THN inkubiert. Dabei wurde die Konzentration von THN konstant gehalten und die von Serotonin schrittweise erhöht. In einer zweiten Versuchsreihe wurde umgekehrt bei fixer Serotoninkonzentration die von THN variiert. Es wurden jeweils zwei Depolarisationsphasen eingeschaltet und die gegenseitige Beeinflussung dabei untersucht.

C.V. AUSWERTUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE MITTELS STATISTISCHER VERFAHREN

C.V.1. Statistische Analyse des THN-Einflusses auf die ^{3}H-5HT-Freisetzung

Im folgenden wird durch einen linearen Regressionsansatz der Form $y = \alpha + \beta \cdot x$ untersucht, ob zwischen der gemessenen ^{3}H-5HT-Ausschüttung und der Zugabe an THN im Superfusionsmedium ein funktionaler Zusammenhang aufgedeckt werden kann. Um unkontrollierte Schwankungen auszugleichen, wurden die prozentualen Messungen an Verlust pro Fraktion ab der 28. Minute bis zum Ende des Versuchs (44. Minute) aggregiert. Setzt man diesen Gesamtwert ins Verhältnis zu der jeweiligen THN-Konzentration, so ergibt sich zwar ein funktionaler Zusammenhang, aber mit einer unbefriedigenden Korrelation, weil die Streuung der Wertepaare um die Regressionsgerade zu groß ist. Da ohnehin zu vermuten ist, daß mit steigender THN-Konzentration die gemessene ^{3}H-5HT-Ausschüttung nicht beliebig steigt, sondern eher einer Sättigungsgrenze zustrebt, wurde der Logarithmus der THN-Werte als unabhängige Variable in das lineare Regressionsmodell eingesetzt, also

$$^3\text{H-5HT-Ausschüttung} = \alpha + \beta \cdot \log (\text{THN}).$$

Damit ergaben sich folgende 7 Wertepaare für die K^+-induzierte ^{3}H-Ausschüttung (Tab. 1).

OBS#	Variable # 1	Variable # 2
1	0.00000	5.42000
2	.69897	7.23000
3	.90309	8.44000
4	1.00000	9.99000
5	1.69897	11.51000
6	1.90309	13.40000
7	2.00000	12.87000

Variable 1:
Logarithmus der THN-Konzentration (in Einheiten von 10^{-6})

Variable 2:
^{3}H-5HT-Freisetzung

Mittels EDV wurden die Parameter α und ß des linearen Modells geschätzt. Es ergaben sich folgende Werte und deren geschätzte Standardabweichung

$\hat{\alpha} = 5,16$ $\qquad S_\alpha = 0,49$
$\hat{ß} = 3,99$ $\qquad S_ß = 0,36$

Das heißt, man kann vermuten, daß folgende funktionale Beziehung besteht für die ^{3}H-5HT-Ausschüttung über den Zeitraum von der 28. bis zur 44. Minute in Abhängigkeit von der THN-Konzentration

$$^3\text{H-5HT-Ausschüttung} = 5,16 + 3,99 \cdot \log([\text{THN}])$$

Die Güte der Schätzung gemessen durch den linearen Korrelationskoeffizienten beträgt R = 0,96 und ist damit sehr gut. Die Ergebnisse verdeutlicht Abb. 10b. Um die Analyse zu ergänzen, wurden noch die 90 % Konfidenzintervalle für die Regressionskoeffizienten und ß bestimmt. Zwar wäre eine Konfidenzzahl von mehr als 90 % wünschenswert, doch wurde hier auf eine übertriebene Genauigkeit verzichtet, weil die Anzahl der Beobachtungen nicht angemessen war.

90%-Konfidenzintervall für α:
$[4,17 ; 6,14]$

90%-Konfidenzintervall für ß:
$[3,26 ; 4,72]$

Diese Intervalle bedeuten folgendes: Wiederholt man die Versuchsserie oft, dann wird in mindestens 90 % der Fälle das Intervall den wahren Wert von α enthalten und nur für 10 % der Intervalle wird das nicht zutreffen (SACHS, 1978, s.S. 90).

Nun soll der Frage nachgegangen werden, ob es sich tatsächlich um eine funktionale Beziehung handelt, die bei ansteigender THN-Konzentration auch zu einem Anstieg der ^{3}H-5HT-Ausschüttung führt. Das heißt, es geht um die Frage, ob ß statistisch signifikant

größer als Null ist. Wir wollen sogar genauer sein und fragen, ob ß größer ist als 3.
Darum wird folgende Nullhypothese formuliert:

$$H_0 : ß \leq 3$$

Als Prüfgröße berechnet man

$$\frac{\hat{ß} - ß_0}{s_ß} = 2{,}75$$

Für diesen t-Test beginnt der Ablehnungsbereich in $t_{5;\ 0{,}05} = 2{,}015$ wenn man 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit zuläßt. Es zeigt sich, daß die Prüfgröße in den Ablehnungsbereich fällt, so daß die Nullhypothese verworfen wird. Also ist das Gegenteil richtig, und man kann behaupten, daß $ß > 3$ gilt. Somit ist ß sicher positiv und damit gilt die Aussage: "Mehr THN bedeutet auch mehr ^{3}H-5HT-Freisetzung".

Abschließend sei noch darauf hingewiesen, daß dieser Regressionsansatz eine Logarithmus-Transformation für die unabhängige Variable "THN-Konzentration" unterstellt. Man darf also aus den dargestellten Ergebnissen keinesfalls schließen, daß hier ein unbegrenzter Zuwachs für die ^{3}H-5HT-Ausschüttung nachgewiesen wurde, wenn man nur die THN-Konzentration beliebig vergrößert. Vielmehr ergibt sich eine deutliche Sättigungsgrenze, wenn man die Logarithmus-Transformation rückgängig macht, was die folgende Abbildung 10a verdeutlicht.

Je mehr THN man zugibt, desto geringer wird also die zusätzliche Ausschüttung an ^{3}H-5-HT, bis schließlich nur noch ein äußerst geringer Effekt auftritt. Wie auch die Abbildung 18 verdeutlicht wird bei 1×10^{-4}M THN ein Sättigungseffekt erzielt. Diese Beobachtung gilt auch für den spontanen ^{3}H-5HT-Ausstrom. Es ist zu vermuten, daß dieser Effekt auf die begrenzte Anzahl von Rezeptoren zurückzuführen ist, über die THN seine Wirkung entfalten kann und einen beschränkten 5-HT-Pool.

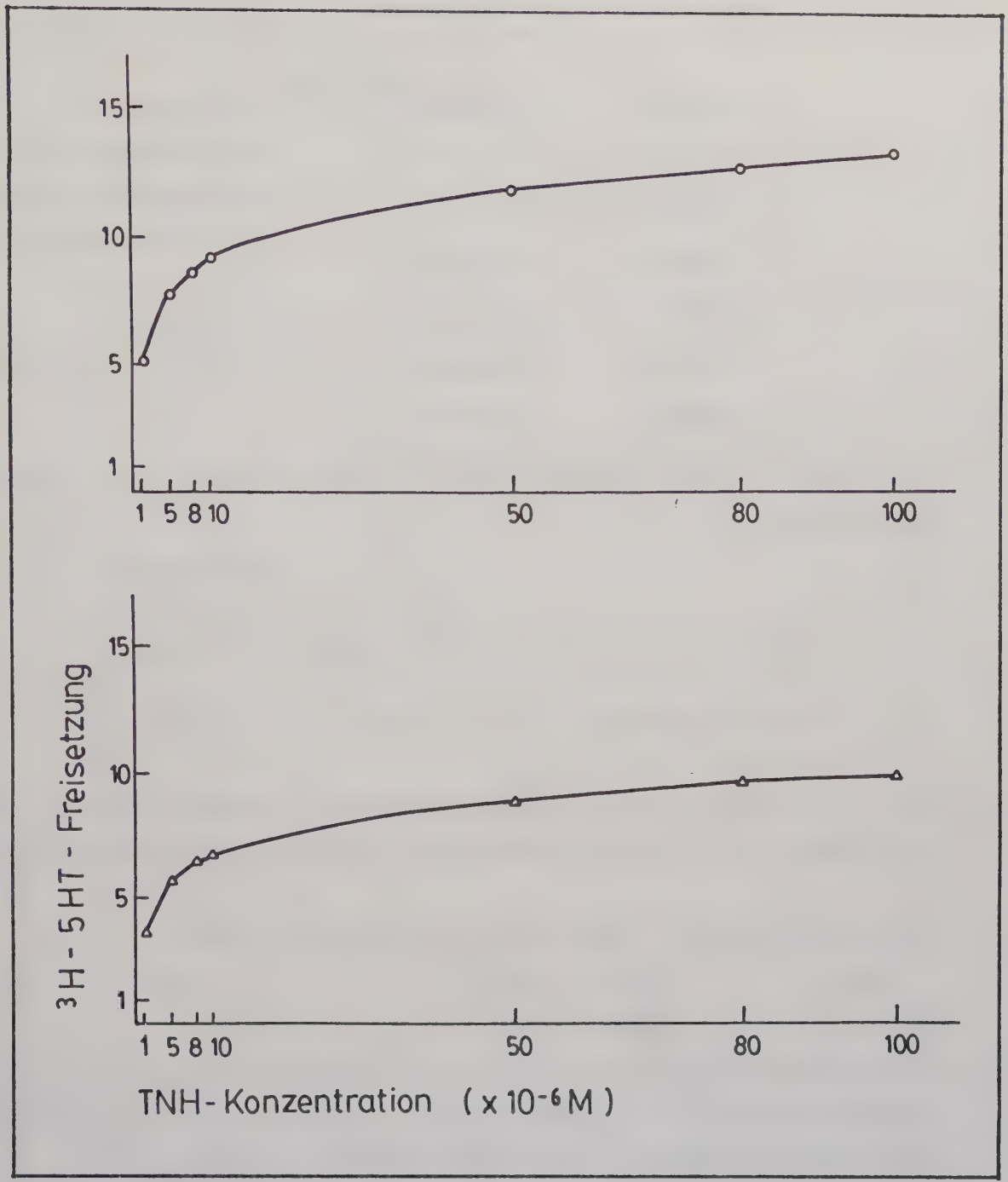


Abb. 10a: Korrelation zwischen der THN-Konzentration und der ^{3}H-5HT-Freisetzung
o—o K^{+}-induzierte ^{3}H-5HT-Ausschüttung
Δ—Δ spontaner ^{3}H-5HT-Ausstrom

Die vorher dargestellte Analyse für die K^{+}-induzierte ^{3}H-5HT-Ausschüttung wurde analog für den spontanen ^{3}H-5HT-Ausstrom durchgeführt. Es wurde wieder der Logarithmus der THN-Werte als unabhängige Variable in das lineare Regressionsmodell eingesetzt. Damit ergaben sich folgende 7 Wertepaare für den spontanen ^{3}H-5HT-Ausstrom (Tab. 2):

OBS#	Variable # 1	Variable # 2
1	0.00000	4.00000
2	.69897	5.51000
3	.90309	6.17000
4	1.00000	6.76000
5	1.69897	8.61000
6	1.90309	9.26000
7	2.00000	10.88000

Variable 1:
Logarithmus der
THN-Konzentration
(in Einheiten von 10^{-6}

Variable 2:
^{3}H-5HT-Freisetzung

Aus dieser Tabelle ergaben sich folgende Schätzwerte und Standa
abweichungen:

$\hat{\alpha} = 3,57$ $\quad S_\alpha = 0,41$

$\hat{ß} = 3,19$ $\quad S_ß = 0,31$

so daß folgende Regressionsfunktion geschätzt wurde:

$$^3\text{H-5HT-Ausstrom} = 3,57 + 3,19 \cdot \log([\text{THN}]).$$

Auch hier zeigt der Korrelationskoeffizient von 0,96 an, daß di
Punktpaare dicht um die geschätzte Gerade liegen (Abb. 10c).

Die dazugehörigen 90%-Konfidenzintervalle lauten

für α: $[2,73 ; 4,41]$

und für ß: $[2,57 ; 3,81]$

Auch hier kann man wieder die Frage stellen, ob die Zunahme der
THN-Konzentration in jedem Fall mit einer Zunahme des ^{3}H-5HT-
Ausstroms einhergeht. Wir fragen sogar, ob $ß \geq 2,5$ gilt.
Für die Nullhypothese

$$H_o : ß \leq 2,5$$

berechnet man als Wert der Prüfgröße 2,23, der größer ist als
$t_{5;0,05} = 2,015$. Er fällt also in den Ablehnungsbereich, so daß
man behaupten kann: ß ist größer als 2,5 und damit immer positi
Also bedeutet auch für den spontanen ^{3}H-5HT-Ausstrom: "Mehr THN
führt zu mehr ^{3}H-5HT-Freisetzung".

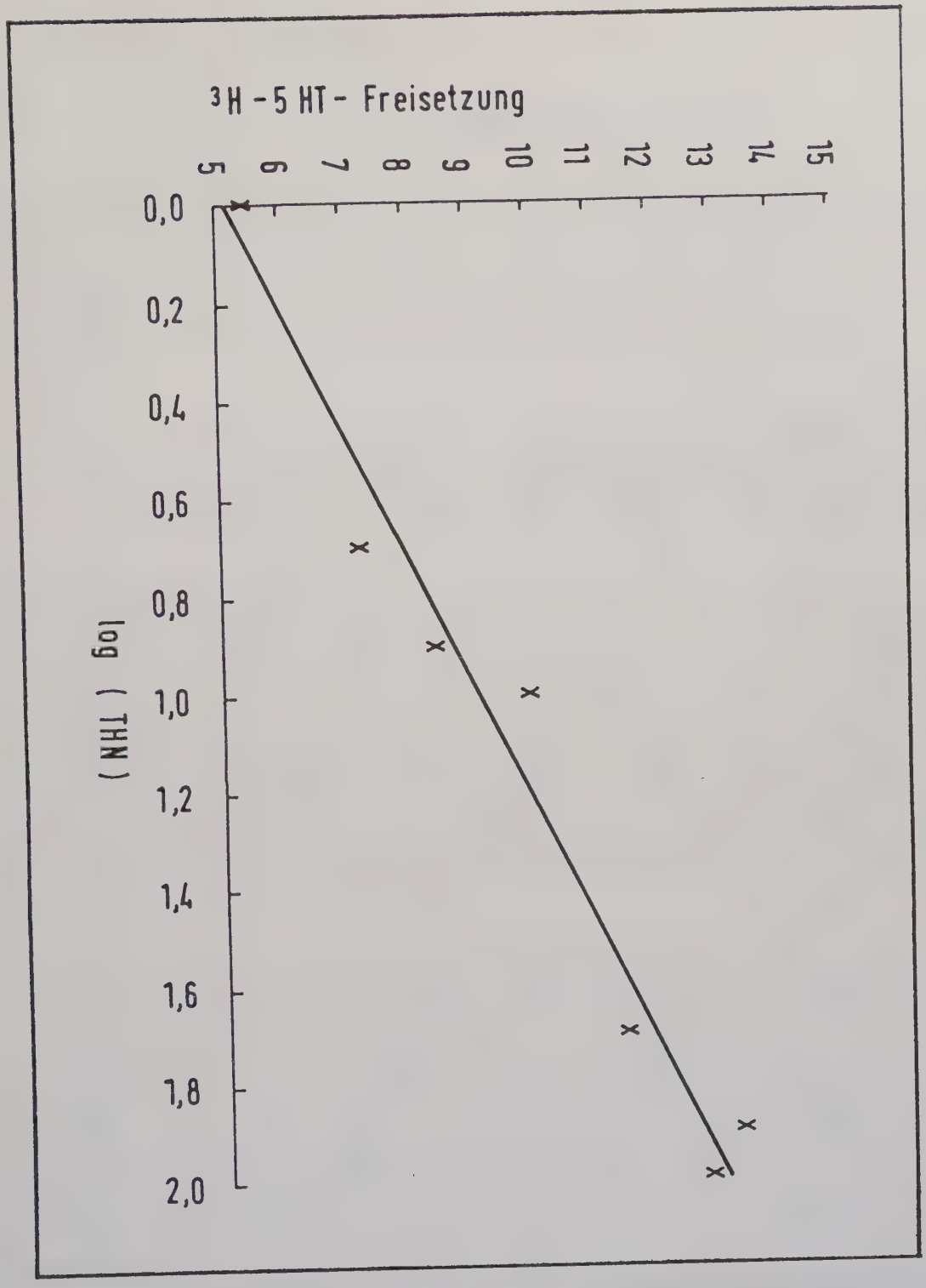


Abb. 10b: Korrelation zwischen der THN-Konzentration und der ^{3}H-5HT-Freisetzung

Einfluß variierter THN-Konzentrationen auf die K^+-induzierte ^{3}H-5HT-Ausschüttung. Aggregierte Werte der K^+-induzierten ^{3}H-5HT-Ausschüttung aller Fraktionen von der 28. bis zur 44. Minute in Abhängigkeit vom Logarithmus der jeweiligen THN-Konzentrationen.

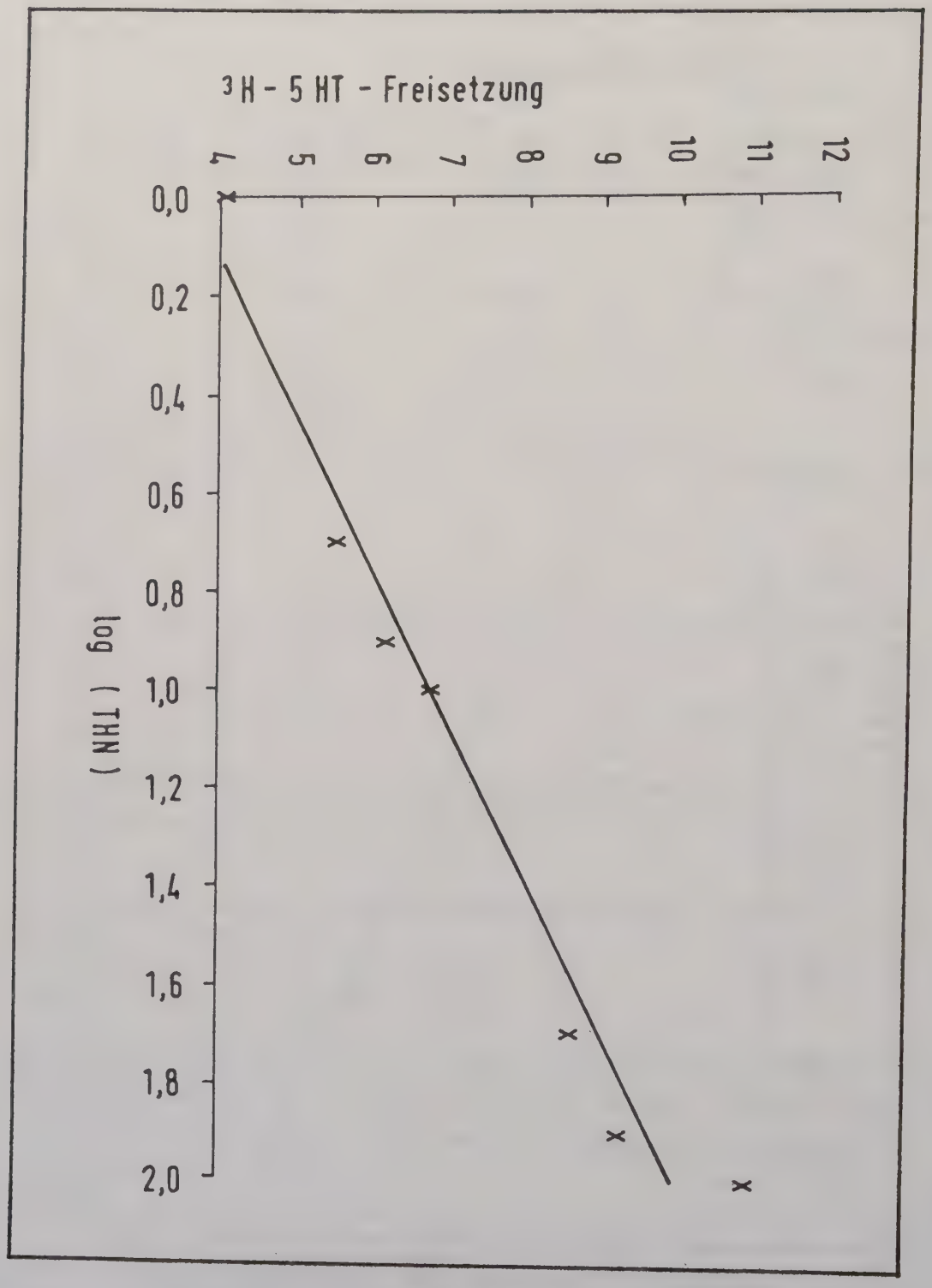


Abb. 10c: Korrelation zwischen der THN-Konzentration und der ^{3}H-5HT-Freisetzung

Einfluß variierter THN-Konzentrationen auf den spontanen ^{3}H-5HT-Ausstrom. Aggregierte Werte des spontanen ^{3}H-5HT-Ausstroms aller Fraktionen von der 28. bis zur 44. Minute in Abhängigkeit vom Logarithmus der jeweiligen THN-Konzentrationen.

Unter Berücksichtigung der statistischen Verteilung für die beiden Parameter ß im Fall der K^+-induzierten ^{3}H-5HT-Ausschüttung bzw. im Fall des spontanen ^{3}H-5HT-Ausstroms würde man daraus auch schließen können, daß im letztgenannten Fall die Zunahme des ^{3}H-5HT-Ausstroms bei gleicher Veränderung der THN-Konzentration geringer ausfällt als im erstgenannten Fall. Danach ist vorstellbar, daß entsprechend der Auswertung Abb. 18 die Sättigung erst bei höherer THN-Konzentration auftritt.

C.V.2. Statistischer Nachweis des Hemmeffekts niedriger THN-Konzentrationen auf die K^+-induzierte ^{3}H-5HT-Ausschüttung

Die Auswertung der Versuchsreihen (s. Abb. 18) legt die Vermutung nahe, daß die Zuführung von THN in niedrigen Konzentrationen die ^{3}H-5HT-Ausschüttung hemmt. Deshalb wurde ein statistischer Test über die Mittelwerte der ^{3}H-5HT-Ausschüttung durchgeführt. Dabei handelt es sich um den sogenannten t-Test, wobei unterstellt wird, daß die Beobachtungen normal verteilt sind. Sicherheitshalber wird davon ausgegangen, daß die Varianzen der beiden Gruppen ungleich sein können. Einzelheiten zu diesem Test finden sich bei SACHS (1978, s.S. 209 ff.).

Die folgenden beiden Gruppen werden in dem Test miteinander verglichen, zum einen die Situation in der 30. Minute für die Versuchseinheiten, deren ^{3}H-5HT-Ausschüttung gemessen wurde, ohne daß THN in der 27. Minute zugeführt worden war, zum anderen die Situation in der 30. Minute für die Versuchseinheiten, denen in der 27. Minute 5×10^{-7}M THN zugeführt worden war. Da es sich nur um eine grundsätzliche Aussage handelt, wird auf die aufwendigen statistischen Tests für alle Gruppen von THN-Konzentrationen verzichtet. Die Referenzgruppe, der kein THN zugeführt worden war, umfaßt 6 Beobachtungen, die andere Gruppe 12. Wir unterscheiden sie im folgenden mit dem Index "THN" und "ØTHN" und erhalten folgende Meßwerte:

Anzahl:	$n_{THN} = 12$	$n_{ØTHN} = 6$
Mittelwerte:	$\bar{x}_{THN} = 258,5$	$\bar{x}_{ØTHN} = 434,4$
Varianzen:	$S^2_{THN} = 2688,9$	$S^2_{ØTHN} = 9055,4$

Unsere Behauptung über die Gruppe lautet: Die ^{3}H-5HT-Ausschüttun ohne THN ist größer als mit THN, d.h. wir vergleichen die beiden Mittelwerte der Gruppe, μ_{THN} und $\mu_{\emptyset THN}$, und behaupten: $\mu_{THN} < \mu_{\emptyset THN}$. Demnach lautet die zu widerlegende Nullhypothese für den t-Test:

$$H_o: \mu_{THN} \geq \mu_{\emptyset THN}$$

Die zugehörige Prüfgröße dieses Test berechnet sich nach (SACHS, 1978, s.S. 214):

$$t = \left(\bar{x}_{THN} - \bar{x}_{\emptyset THN}\right) \Big/ \left(\sqrt{\frac{S^2_{THN}}{n_{THN}} + \frac{S^2_{\emptyset THN}}{n_{\emptyset THN}}}\right)$$

und es ergibt sich t = -5,07. Der Ablehnungsbereich würde bei einem Signifikanzniveau von 10 % bei diesem einseitigen Test bei -1,337 anfangen und bis $-\infty$ reichen. Die Freiheitsgrade errechn sich aus:

$$FG = \left(\frac{S^2_{THN}}{n_{THN}} + \frac{S^2_{\emptyset THN}}{n_{\emptyset THN}}\right)^2 \Big/ \left[\frac{\left(\frac{S^2_{THN}}{n_{THN}}\right)^2}{n_{THN^{-1}}} + \frac{\left(\frac{S^2_{\emptyset THN}}{n_{\emptyset THN}}\right)^2}{n_{\emptyset THN^{-1}}}\right]$$

Einsetzen der Werte ergibt 15,74 $\approx$ 16. Mithin stellen wir fest, daß die Prüfgröße in den Ablehnungsbereich fällt und somit die Nullhypothese als widerlegt angesehen werden kann, was bedeutet, daß unsere Behauptung gültig ist und wir einen Hemmeffekt nachgewiesen haben.

D. E R G E B N I S S E

DI. THN-EINFLUSS AUF DIE ^{3}H-5HT-FREISETZUNG

DI1. Vorversuche nach Inkubation mit ^{3}H-5-HT

Mit den durchgeführten Experimenten sollte untersucht werden, unter welchen Bedingungen 5-HT spezifisch aus serotonergen Neuronen ausgeschüttet wird. Zunächst wurden die Gewebeschnitte des Hypothalamus der Ratte mit 2,5 x 10^{-7}M ^{3}H-5-HT für 10 Minuten inkubiert. Diese niedrige Konzentration des radioaktiven Transmitters führt zu einer selektiven Markierung der Neurone, die den Transmitter auch unter physiologischen Bedingungen enthalten (SNYDER et al., 1970). Im Hypothalamus liegen vermehrt serotonerge Nervenendigungen vor. Unter dieser Voraussetzung wurde angenommen, daß anschließend aus der Gewebepräparation freigesetztes ^{3}H-5-HT auch tatsächlich aus serotonergen Neuronen stammt.

DI1a. ^{3}H-Freisetzung in Abhängigkeit von der K^{+}-Konzentration und der Depolarisationszeit

Eine Voraussetzung für die induzierte Ausschüttung des Transmitters ist ein quasi physiologischer Stimulus. Dazu setzten wir die K^{+}-induzierte Depolarisation ein. Die erhöhte extrazelluläre K^{+}-Konzentration ist ein effektiver Stimulus für die spezifische Ausschüttung des Transmitters (ORREGO, 1979; LEVI & RAITERI, 1976).

Wir untersuchten einen Konzentrationsbereich von 11 - 41 mmol/l K^{+}. Dabei wurde von der 8. bis zur 13. und von der 28. bis zur 33. Minute der Sammelperiode stimuliert. Während dieser Zeit war dem Superfusionsmedium CGP 6085/A ein Hemmstoff der spezifischen Wiederaufnahme des Transmitters zugesetzt. Ein deutlicher Effekt zeigt sich bei 31 mmol/l K^{+} während der ersten und zweiten Stimulationsphase. Obwohl bei 41 mmol/l K^{+} der Effekt noch ausgeprägter ist, zogen wir für die folgenden Versuche die niedrigere K^{+}-Konzentration vor, da mit zunehmender Intensität des K^{+}-Stimulus die präsynaptischen Rezeptoren beeinflußt werden (OSBORNE & HERZ, 1980). Diese Rezeptoren spielen eine Rolle im Feedback-Mechanismus zur Kontrolle der Transmitterausschüttung. Mit K^{+}-

Konzentrationen von 56 mM im Superfusionsmedium ließ sich kein Modulation der NA-Ausschüttung nachweisen. Die K^+-Abhängigkeit präsynaptischen Rezeptoren gibt einen Hinweis auf die möglichen Mechanismen, über welche die Rezeptoraktivierung die Transmitterausschüttung moduliert: Erstens ein direkter Effekt durch Herabsetzen des Verhältnisses der Na^+- zur K^+-Permeabilität im Sinne einer Hyperpolarisation. Zweitens ein indirekter Effekt durch Reduktion des für den spezifischen Ausschüttungsprozeß verfügbaren Calciums (DISMUKES et al., 1977).

In Abbildung 11 ist die K^+-stimulierte ^3H-Ausschüttung bezogen auf den spontanen ^3H-Ausstrom dargestellt. Dabei wurde die ^3H-Freisetzung nach Stimulation mit 11, 31 und 41 mmol/l K^+ gemessen. Der spontane ^3H-Ausstrom erfolgte unabhängig von hoher K^+-Konzentration. Der K^+-Gehalt des üblichen KRB-Puffers beträgt 6 mmol/l. In diesem Superfusionsmedium war während der beiden Stimulationsphasen allein CGP 6085/A anwesend. Dabei zeigt sich daß CGP 6085/A keinen Einfluß auf die spezifische Ausschüttung

In Abbildung 12 wurde die Stimulationszeit variiert; dabei wurde die ^3H-Ausschüttung in Abhängigkeit von 1, 2 und 5minütiger Stimulation mit 31 mmol/l K^+ untersucht. Ein deutlicher Effekt, auch bei der wiederholten Stimulation, ist erst während 5minütiger Stimulation nachweisbar. Im Kurvenverlauf tritt eine maximale Wirkung 8 Minuten nach Beginn der Stimulation auf und fällt während der folgenden 4 Minuten bei niedriger K^+-Konzentration steil ab. Dieser Kurvenverlauf zeigt deutliche Unterschiede im Vergleich zu der unspezifischen Ausschüttung aus Gliazellen bzw. aus löslicher intraneuronaler Lokalisation, wie sie von VARGAS und Mitarbeitern (1977) beschrieben wurde. Die K^+-stimulierte ^3H-Ausschüttung ist wieder dargestellt in Bezug auf den spontanen ^3H-Ausstrom. Für die folgenden Experimente wählten wir eine 5minütige Stimulation mit 31 mmol/l K^+. Dies entsprach der kürzesten Stimulationszeit und der niedrigsten K^+-Konzentration, die noch zu einer deutlich meßbaren Transmitterausschüttung führten.

Abb. 11: Einfluß der K^+-Konzentration auf die ^3H-Freisetzung

Markierung der Gewebeschnitte des Hypothalamus der Ratte mit $2,5 \times 10^{-7}$M ^3H-5HT für 10 min. bei 37°C

⊢——⊣ Stimulation mit hoher K^+-Konzentration von der 8. - 13. und 28. - 33. min.

Das obere Kurvenpaar zeigt die K^+-induzierte ^3H-Ausschüttung in Abhängigkeit von variierten K^+-Konzentrationen

◇—◇ mit 41 mmol/l K^+-induzierte Depolarisation (n=4)

○—○ mit 31 mmol/l K^+-induzierte Depolarisation (n=12)

Das untere Kurvenpaar zeigt die K^+-induzierte ^3H-Ausschüttung in Abhängigkeit von variierten K^+-Konzentrationen und den spontanen ^3H-Ausstrom

□—□ mit 11 mmol/l K^+-induzierte Depolarisation (n=4)

△—△ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=4)

Abb. 11

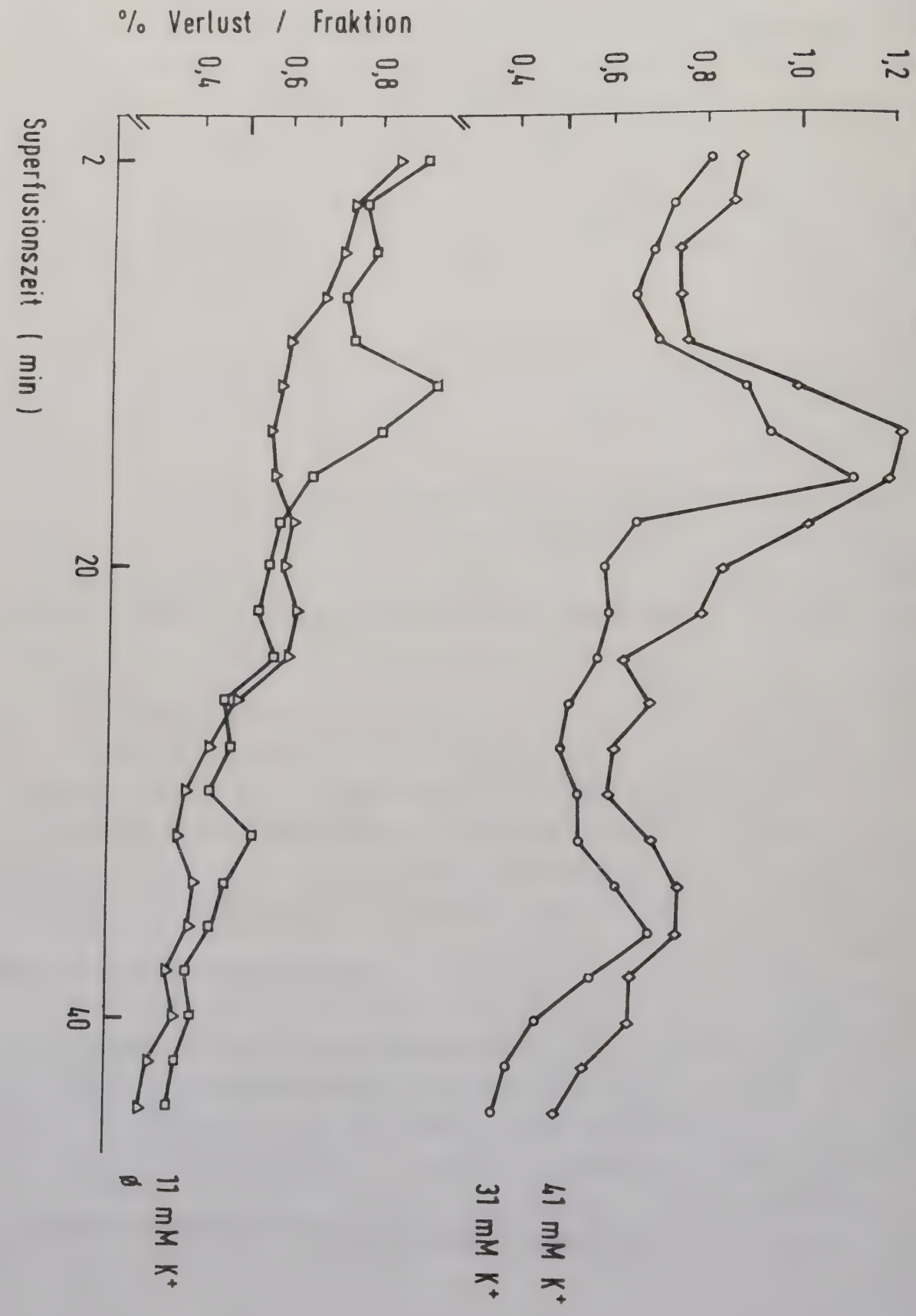

% Verlust / Fraktion
0,4
0,6
0,8
1,0
1,2
2
20
40
Superfusionszeit (min)
41 mM K+
31 mM K+
11 mM K+
ø

Abb. 12: Einfluß der Dauer der Depolarisationszeit auf die ^{3}H-Freisetzung

Markierung der Gewebeschnitte des Hypothalamus der Ratte mit 2,5 x 10^{-7}M ^{3}H-5-HT für 10 min. bei 37°C

⊢—⊣ Stimulation mit 31 mmol/l K^{+} mit der 8. und 28. min. beginnend

Das obere Kurvenpaar zeigt die K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung in Abhängigkeit von der Stimulationszeit.

○—○ mit K^{+}-induzierter Depolarisation während 5 min. (n=12)

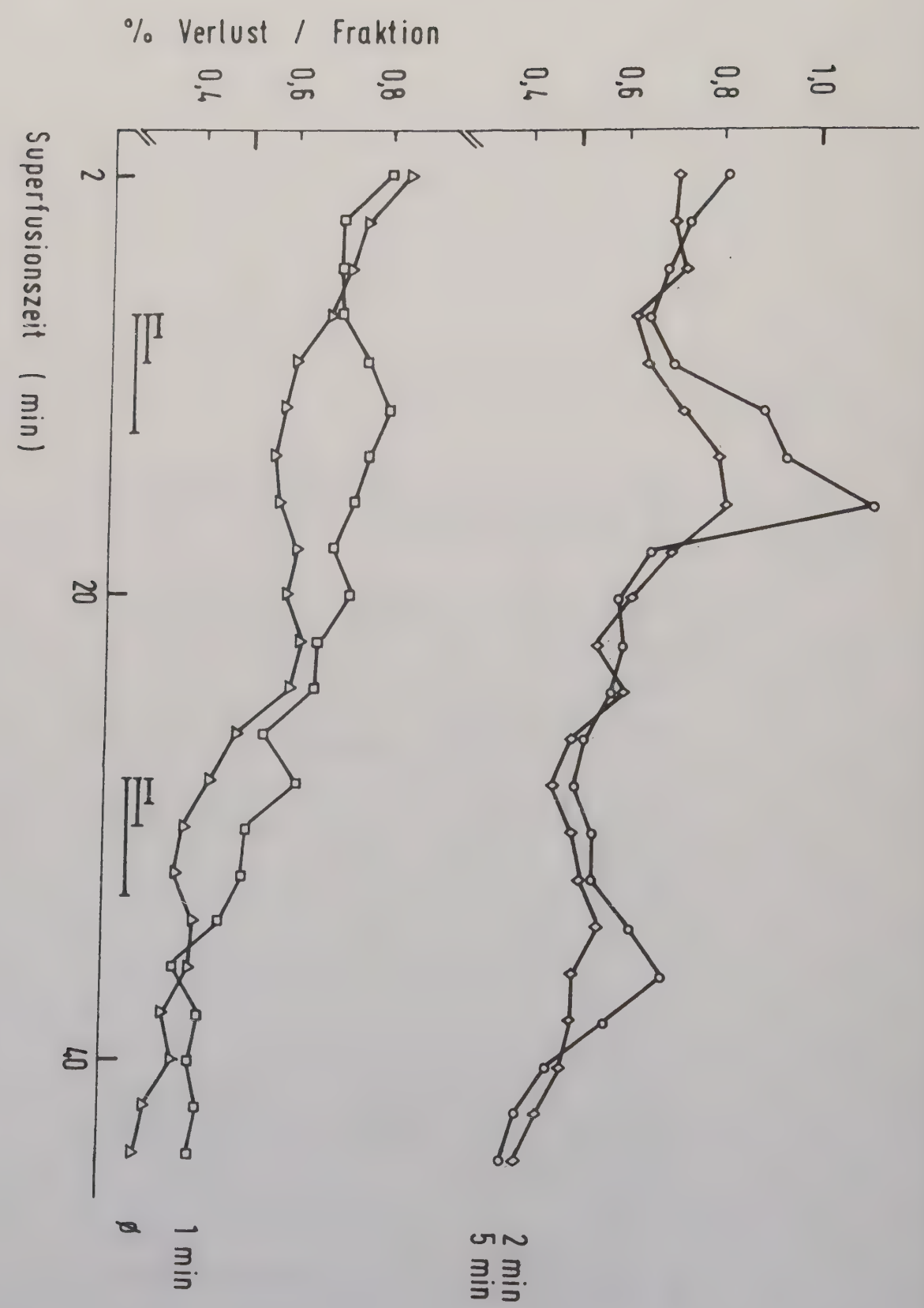
◇—◇ mit K^{+}-induzierter Depolarisation während 2 min. (n=4)

Das untere Kurvenpaar zeigt die K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung in Abhängigkeit von der Stimulationszeit und den spontanen ^{3}H-Ausstrom

□—□ mit K^{+}-induzierter Depolarisation während 1 min. (n=4)

△—△ ohne K^{+}-induzierte Depolarisation (n=4)

Abb. 12


% Verlust / Fraktion
0,4
0,6
0,8
1,0
Superfusionszeit (min)
2
20
40
I
II
2 min
5 min
1 min
ø

DI1b. ^{3}H-Freisetzung nach Reserpin-Vorbehandlung

Die spezifische Ausschüttung des Transmitters stellt man sich als exocytotischen Prozeß direkt aus den Vesikeln vor. Dieser Ausschüttungsmechanismus setzt eine Aufnahme des Transmitters in diese Speichergranula voraus. Mit der Reserpin-Vorbehandlung sollte untersucht werden, ob das durch K^{+}-Depolarisation freigesetzte ^{3}H-5-HT aus den Vesikeln stammt. Reserpin ist ein häufig angewandter Hemmstoff der Transmitteraufnahme und/oder -speicherung in Vesikeln (zur Übersicht siehe: SLOTKIN, 1974).

In Anlehnung an ROSS (1979) und HOLZ und COYLE (1974) erhielten die Tiere insgesamt 7,5 mg/kg Reserpin i.p. in 2 Einzeldoesen. Die erste Dosis (5 mg/kg) wurde 18 Stunden und die letzte (2,5 mg/kg) 1 1/2 Stunden vor Versuchsbeginn verabreicht, d.h. vor der Dekapitation der Ratten. Zu diesem Zeitpunkt waren an den Tieren Katalepsie, Rigor und Intentionszittern zu beobachten. Die Gewebepräparation wurde nach der Inkubation mit ^{3}H-5-HT während der anschließenden Superfusion zweimalig mit hoher K^{+}-Konzentration stimuliert, von der 8. bis zur 13. und von der 28. bis zur 33. Minute.

In Abbildung 13 ist der Effekt der Reserpin-Vorbehandlung dargestellt. Die oberen Kurven wurden mit Hypothalamusschnitten von unbehandelten Tieren erzielt. Dabei führte die wiederholte K^{+}-Stimulation zu einer gesteigerten ^{3}H-5HT-Ausschüttung. Dagegen konnte nach Reserpin-Vorbehandlung, wie das untere Kurvenpaar zeigt, keine K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung ausgelöst werden. Außerdem fällt an diesem Kurvenverlauf auf, daß der spontane ^{3}H-Ausstrom nicht deutlich erhöht ist. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, daß vesikulär-gebundenes 5-HT bei der spezifischen Ausschüttung des Transmitters freigesetzt wird (SHORE, 1972).

Die Ca^{+}-Abhängigkeit dieses Ausschüttungsmechanismus konnte von unserer Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen werden (ROMMELSPACHER & SUBRAMANIAN, 1979). Nach unseren Superfusionsexperimenten ist anzunehmen, daß 5-HT spezifisch aus serotonergen Neuronen ausgeschüttet wird.

Abb. 13: Einfluß der Reserpin-Vorbehandlung der Ratten auf die ^{3}H-Freisetzung

Markierung der Gewebeschnitte des Hypothalamus der Ratte mit $2,5 \times 10^{-7}$ M ^{3}H-5-HT für 10 min. bei 37°C.

⊢—⊣ Stimulation mit 31 mmol/l K^{+} von der 8. - 13. und 28. - 33. min.

Das obere Kurvenpaar zeigt die K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung und den spontanen ^{3}H-Ausstrom ohne vorausgegangene Reserpin-Behandlung der Ratten

○—○ mit K^{+}-induzierter Depolarisation (n=4)

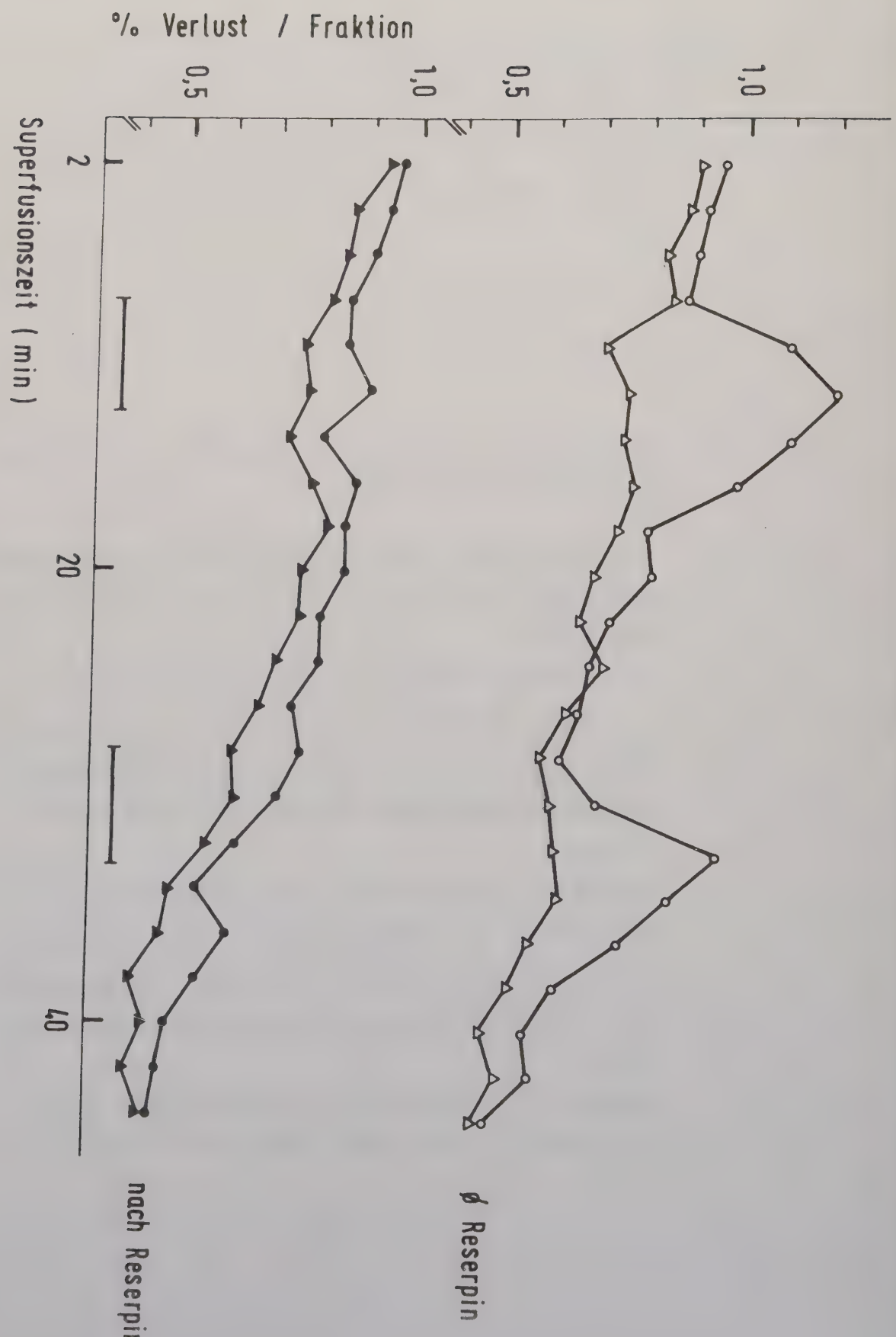
△—△ ohne K^{+}-induzierte Depolarisation (n=2)

Das untere Kurvenpaar zeigt die K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung und den spontanen ^{3}H-Ausstrom nach vorausgegangener Reserpin-Behandlung der Ratten

●—● mit K^{+}-induzierter Depolarisation (n=4)

▲—▲ ohne K^{+}-induzierte Depolarisation (n=2)

Abb. 13


% Verlust / Fraktion
0,5
1,0
0,5
1,0
2
20
40
Superfusionszeit (min)
ø Reserpin
nach Reserpin

DI?. Einfluß ansteigender THN-Konzentrationen auf die ^{3}H-Freisetzung

Mit den folgenden Experimenten wurde die Frage untersucht, ob THN modulierend auf serotonerge Neurone wirkt. Die THN-Wirkung könnte über eine vermehrte oder verminderte Ausschüttung des Überträgerstoffes 5-HT erfolgen.

Zunächst wurde nach Inkubation der Hypothalamusschnitte mit ^{3}H-5-HT während der anschließenden Superfusion die K^{+}-stimulierte und spontane ^{3}H-5HT-Freisetzung jeweils ohne THN-Zugabe gemessen (Abb. 14).

In Abbildung 14a bis h ist der Einfluß von ansteigenden THN-Konzentrationen auf die Freisetzung von ^{3}H-5-HT dargestellt. Der THN-Effekt wurde in einem Konzentrationsbereich von 5 x 10^{-7}M bis 1 x 10^{-4}M THN untersucht. Die jeweilige Dosis wurde während der Superfusion dem Superfusionsmedium von der 27. bis zur 44. Minute zugesetzt. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 15 zusammengefaßt; dabei sind die 2- bis 26-Minutenwerte jeweils Mittelwerte der Kurven 15a bis h des entsprechenden Zeitraumes.

Abbildung 15a zeigt die THN-Wirkung auf die K^{+}-induzierte ^{3}H-5HT-Ausschüttung. Zunächst wurde die Präparation auf Stimulationsfähigkeit untersucht, indem über 5 Minuten eine vergleichsweise hohe K^{+}-Konzentration von 31 mM und CGP 6085/A dem Superfusionsmedium zugesetzt wurde. Nach Abklingen dieses Effekts wurde THN dem KRB-Puffer ab der 27. Minute zugegeben, und eine Minute später wurde eine erneute Depolarisation durch Zugabe der hohen K^{+}-Konzentration ausgelöst. Wie auf der Abbildung zu sehen ist, führen niedrige THN-Konzentrationen zu einer verminderten ^{3}H-5HT-Ausschüttung. Die niedrigste THN-Konzentration

von 5 x 10^{-7} M im Superfusionsmedium löst diesen Effekt am deutlichsten aus. Dabei wurde die ^{3}H-5HT-Ausschüttung nach THN-Zugabe in den Fraktionen bestimmt. Die ersten beiden Fraktionen zeigen einen deutlichen Abfall der freigesetzten Radioaktivität. Dieser Hemmeffekt auf die Transmitterausschüttung wird wahrscheinlich überlagert, wenn höhere Konzentrationen im synaptischen Spalt wirksam werden. Dagegen rufen höhere THN-Konzentrationen einen dosisabhängigen Anstieg der ^{3}H-5HT-Ausschüttung hervor mit einem schnellen Wirkungseintritt. Dieser THN-Effekt ist höchstwahrscheinlich ein extrazellulärer, da sich durch die Zugabe von CGP 6085/A eine intrazelluläre Wirkung ausschließen läßt. Es bleibt die Frage, ob es sich dabei um einen unspezifischen Membraneffekt oder einen spezifischen Effekt auf präsynaptische Rezeptoren handelt. Die Arbeitsgruppe um PEURA (1982) konnte den Nachweis erbringen, daß ß-Carboline die Fluidität der Membran beeinflussen. Damit könnte eine erhöhte Transmitterausschüttung verbunden sein. Es ist bemerkenswert, daß nicht nur die K^{+}-induzierte Ausschüttung beeinflußt wird, sondern auch der basale ^{3}H-5HT-Ausstrom. Zur Veranschaulichung des THN-Effekts wurde in Abbildung 16a und b die räumliche Darstellung der Superfusionszeit während der THN-Zugabe gewählt, also von der 27. bis zur 44. Minute. Abbildung 16a zeigt den Einfluß ansteigender THN-Konzentrationen auf die K^{+}-stimulierte ^{3}H-5HT-Ausschüttung. In Abbildung 16b ist der THN-Effekt auf den spontanen ^{3}H-5HT-Ausstrom dargestellt.

In Abbildung 18 wurde eine andere Darstellungsweise für die Ergebnisse der Abbildung 16 angewandt. Es zeigt die Dosis-Wirkungs Kurve des THN-Effekts auf die ^{3}H-5HT-Ausschüttung. Dazu wurden die Flächen während und nach der zweiten K^{+}-Stimulation planimetriert, bzw. die entsprechenden Zeiträume des spontanen ^{3}H-

5HT-Ausstroms. In der Verkleinerung von Abbildung 15a und b (Abb. 17) ist diese Vorgehensweise veranschaulicht. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 3a aufgeführt. Diese Werte wurden dividiert durch den jeweils zugehörigen Wert der Fläche der ^{3}H-5HT-Freisetzung ohne THN-Zugabe (S, schraffierte Fläche in Abb. 17). Das Ergebnis ist in Abbildung 18 entsprechend der Tabelle 3b dargestellt. Mit dieser Darstellungsweise kann der Hemmeffekt niedriger THN-Konzentrationen auf die K^{+}-induzierte ^{3}H-5HT-Ausschüttung sowie das Plateau, das mit hohen THN-Konzentrationen erreicht wird, verdeutlicht werden (●—●, o—o). Der Punkt, der vor den Kurven liegt, repräsentiert das Ergebnis mit THN-freiem Superfusionsmedium. Die Kurven des spontanen ^{3}H-5HT-Ausstroms (▲—▲, △—△) zeigen weder einen deutlichem Hemmeffekt niedriger THN-Konzentrationen noch das Plateau höherer THN-Konzentrationen; im Kurvenverlauf ist eine Linksverschiebung zu beobachten.

Der rasche Wirkungseintritt von THN wie auch der Hemmeffekt niedriger THN-Konzentrationen sprechen für eine THN-Wirkung über membran-gebundene Rezeptorstellen. Für 5-HT ist ein Hemmmechanismus über präsynaptische Autorezeptoren bekannt (GÖTHERT et al., 1979; FOZARD, 1979). Niedrige THN-Konzentrationen könnten diese serotonergen Rezeptoren stimulieren, während hohe THN-Konzentrationen sie hemmen könnten.

Abb. 14, a-h: Einfluß variierter THN-Konzentrationen auf die ^{3}H-Freisetzung

Markierung der Gewebeschnitte des Hypothalamus der Ratte mit $2,5 \times 10^{-7}$ M ^{3}H-5-HT für 10 min. bei 37°C
⊢—⊣ Stimulation mit 31 mmol/l K^{+} von der 8. - 13. und 28. - 33. min.

Abb. 14 zeigt die K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung und den spontanen ^{3}H-Ausstrom ohne THN-Zugabe zum Superfusionsmedium.
○—○ mit K^{+}-induzierter Depolarisation (n=12)
△—△ ohne K^{+}-induzierte Depolarisation (n=4)

Abb. 14 a-h zeigen die K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung und den spontanen ^{3}H-Ausstrom nach Zugabe ansteigender THN-Konzentrationen zum Superfusionsmedium von der 27. - 44. min. ⊢—⊣
○—○ mit K^{+}-induzierter Depolarisation
△—△ ohne K^{+}-induzierte Depolarisation

a) 5×10^{-7} M THN, ○—○ n = 6, △—△ n = 2
b) 1×10^{-6} M THN, ○—○ n = 6, △—△ n = 3
c) 5×10^{-6} M THN, ○—○ n = 4, △—△ n = 4
d) 8×10^{-6} M THN, ○—○ n = 4, △—△ n = 3
e) 1×10^{-5} M THN, ○—○ n = 8, △—△ n = 4
f) 5×10^{-5} M THN, ○—○ n = 4, △—△ n = 4
g) 8×10^{-5} M THN, ○—○ n = 4, △—△ n = 3
h) 1×10^{-4} M THN, ○—○ n = 4, △—△ n = 2

Abb. 14

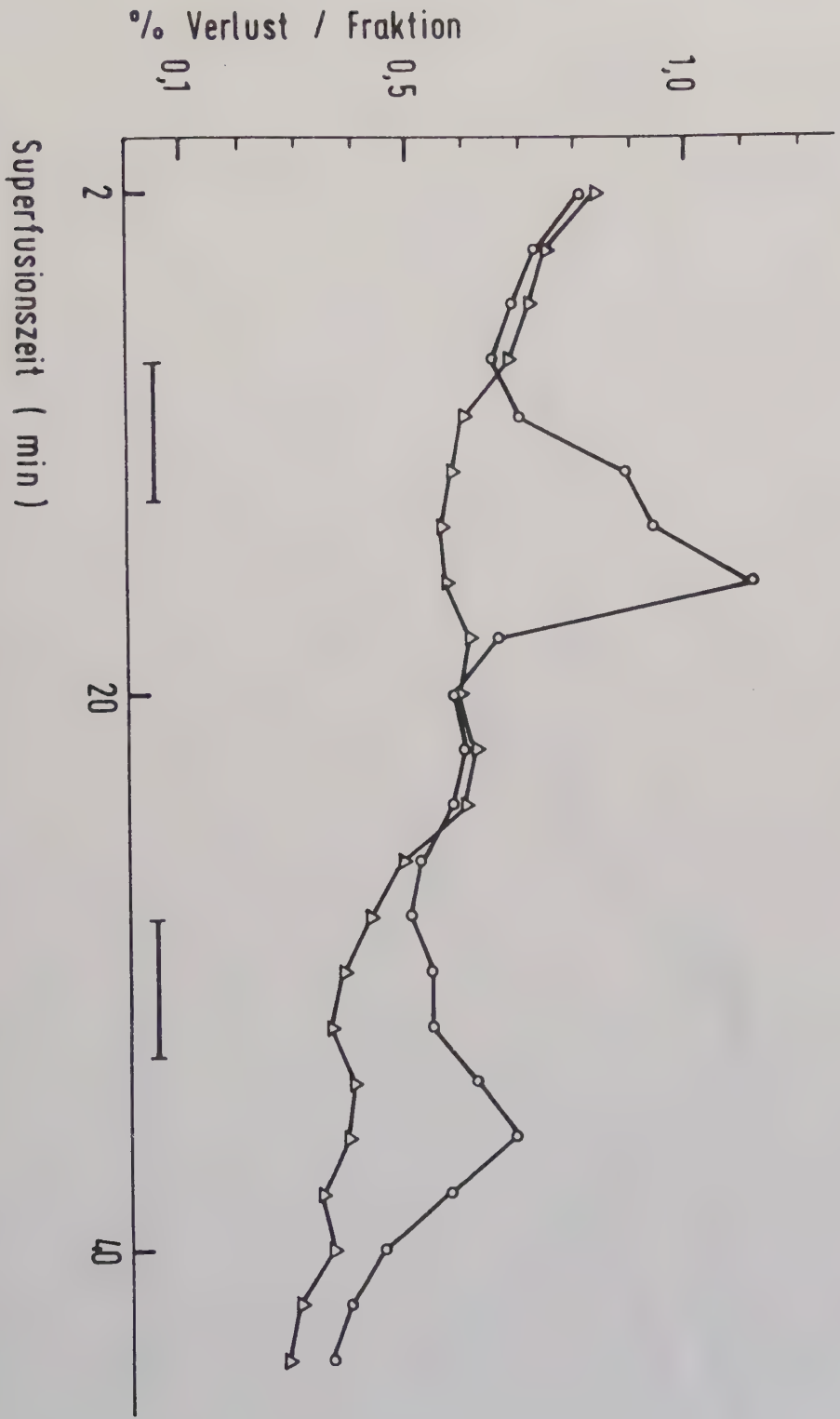


Abb. 14a

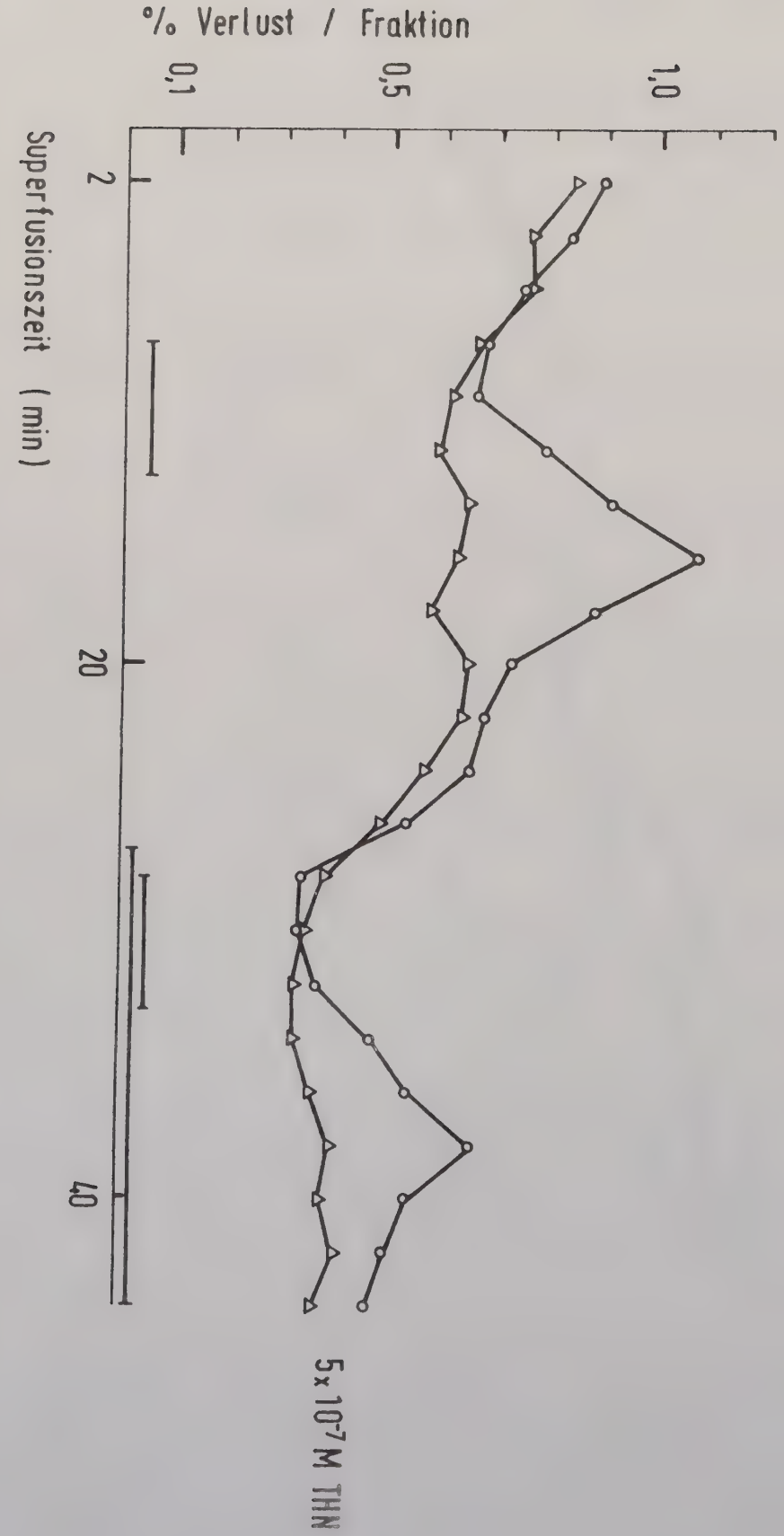

% Verlust / Fraktion
0,1
0,5
1,0
2
20
40
Superfusionszeit (min)
5x10⁻⁷M THN

Abb. 14b

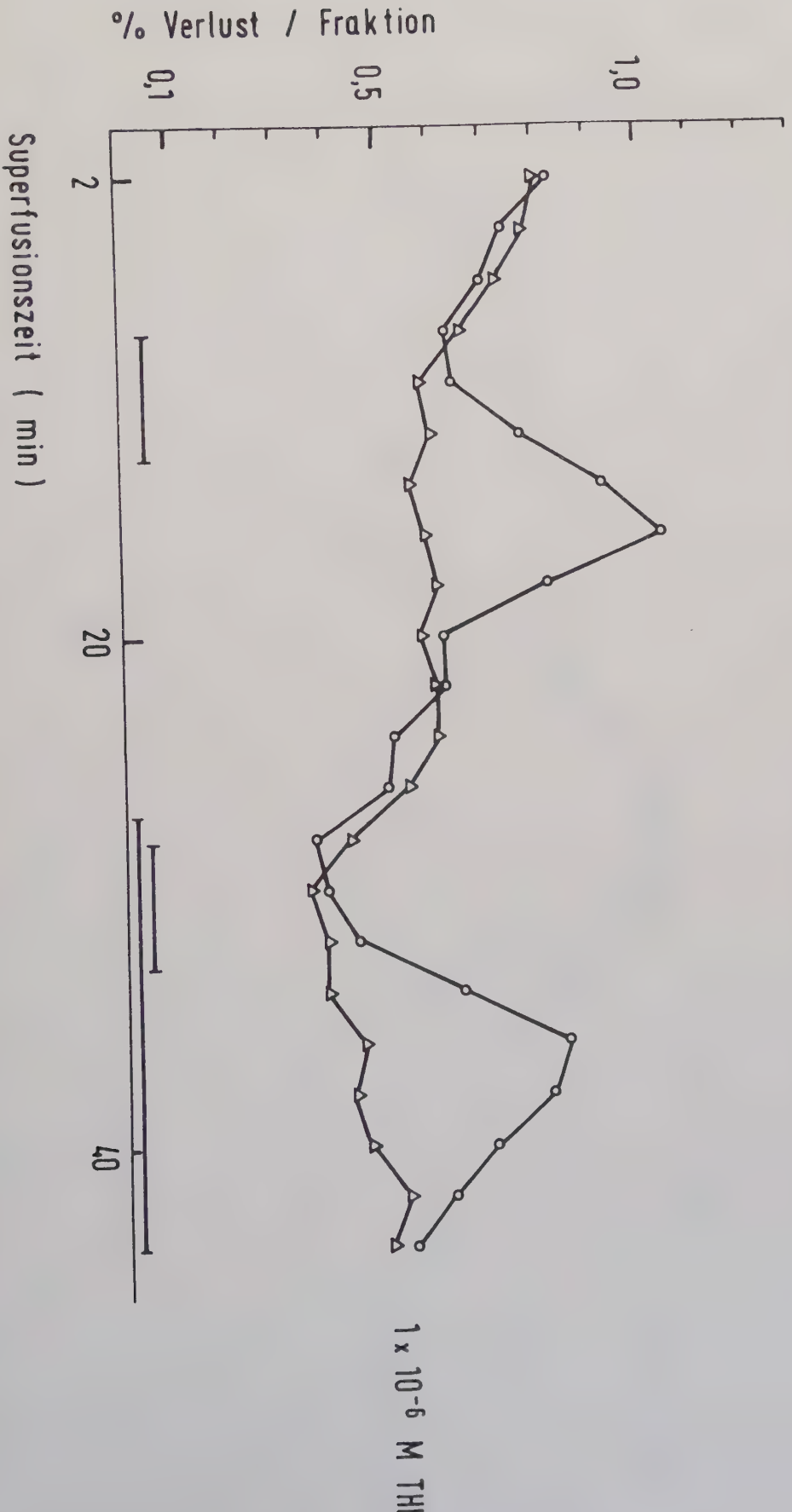

% Verlust / Fraktion
0,1
0,5
1,0
2
20
40
Superfusionszeit (min)
1 x 10-6 M THN

Abb. 14c

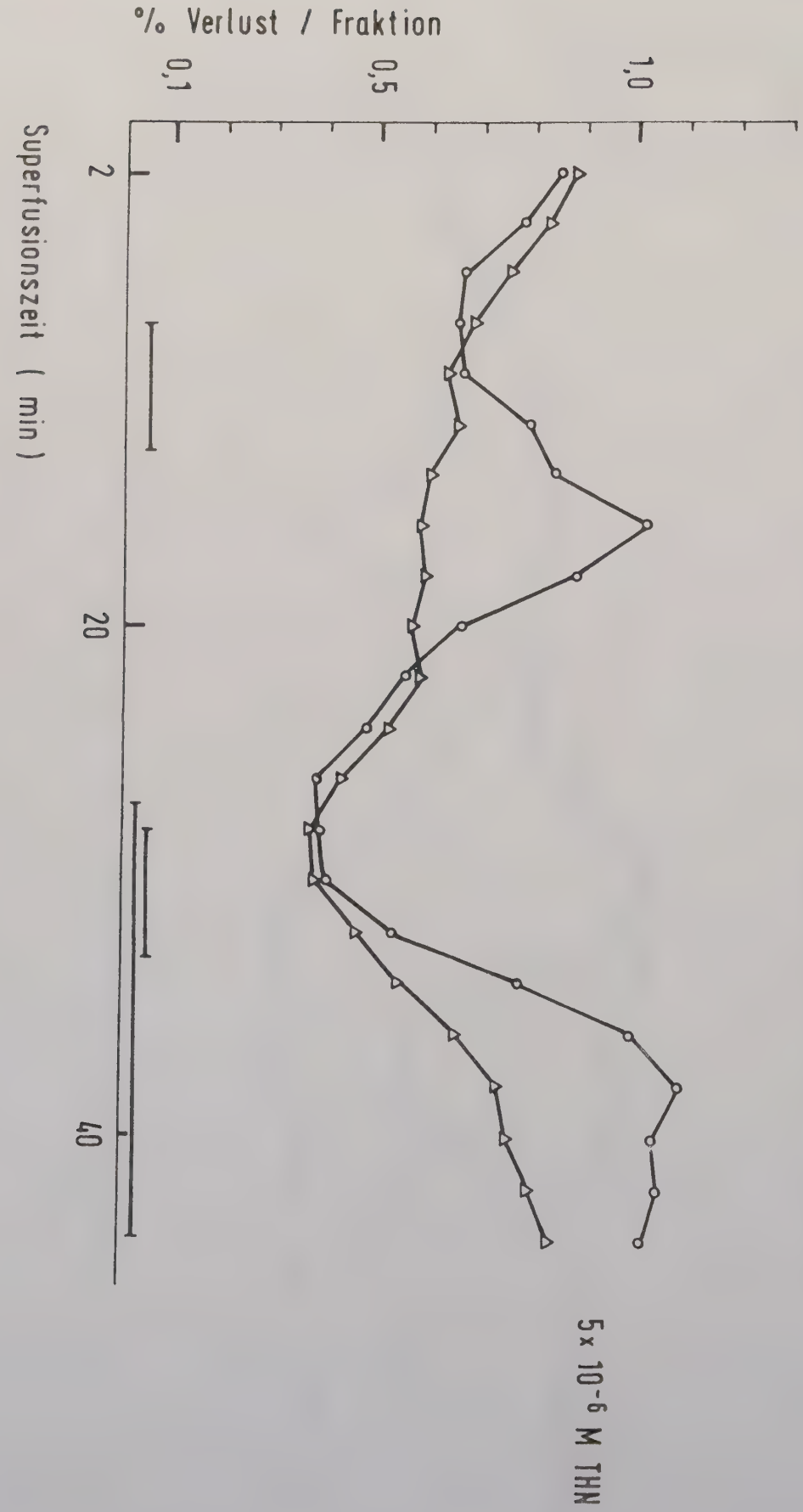

% Verlust / Fraktion
0,1
0,5
1,0
2
20
40
Superfusionszeit (min)
5x 10-6 M THN

Abb. 14d

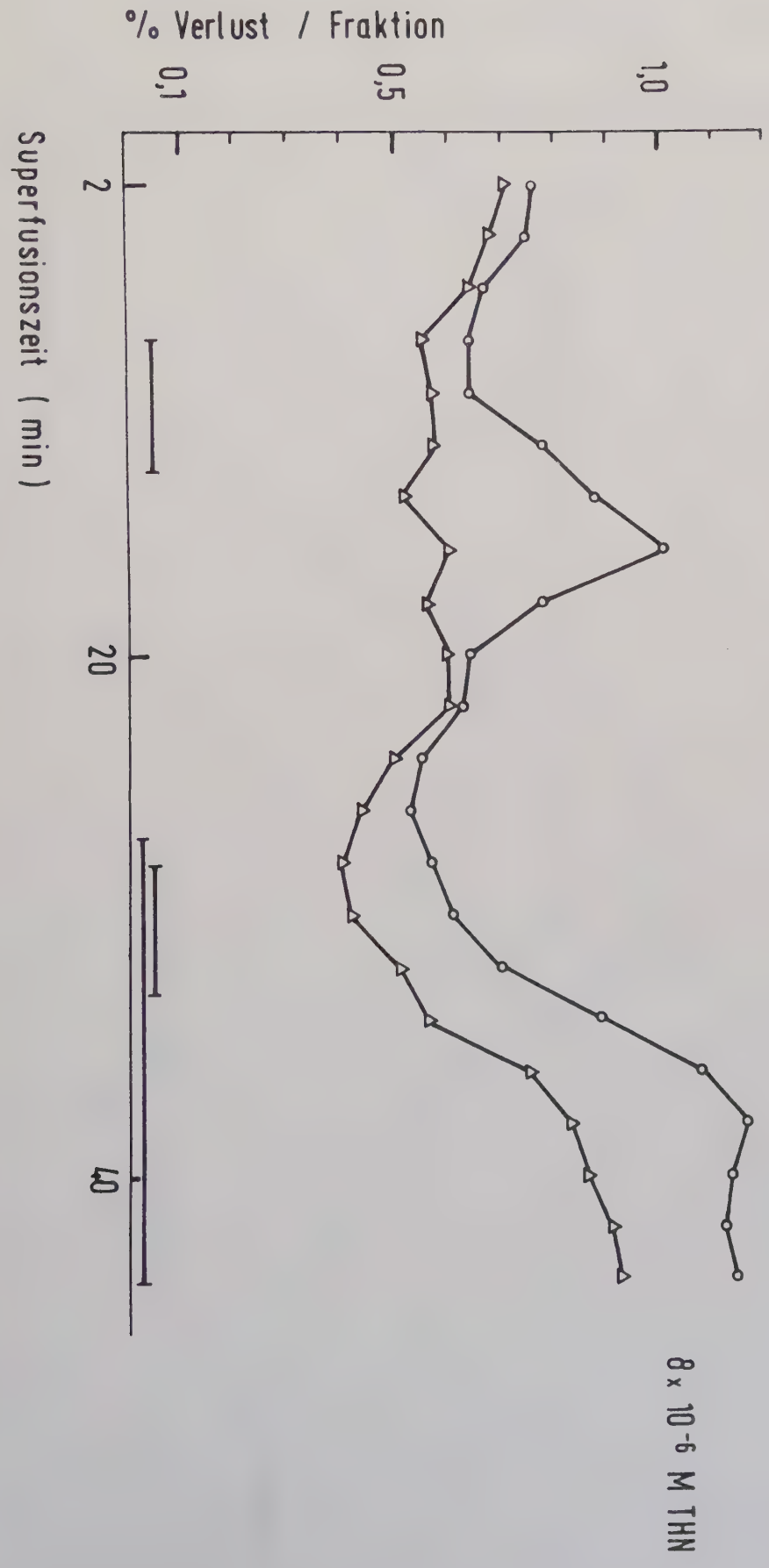

% Verlust / Fraktion
0,1
0,5
1,0
2
20
40
Superfusionszeit (min)
8 x 10-6 M THN

Abb. 14e

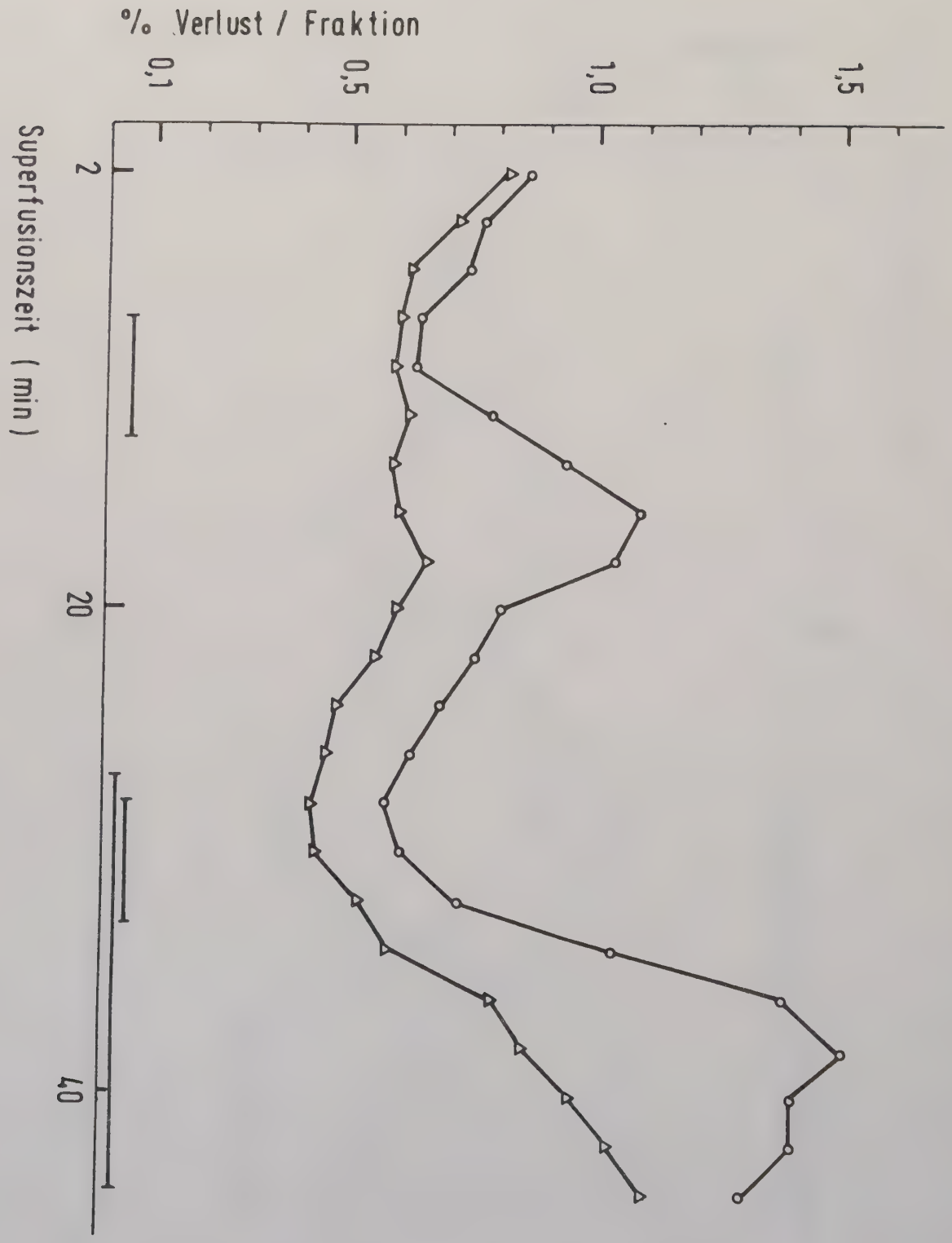

% Verlust / Fraktion
0,1
0,5
1,0
1,5
2
20
40
Superfusionszeit (min)
1 x 10-5 M THN

Abb. 14f

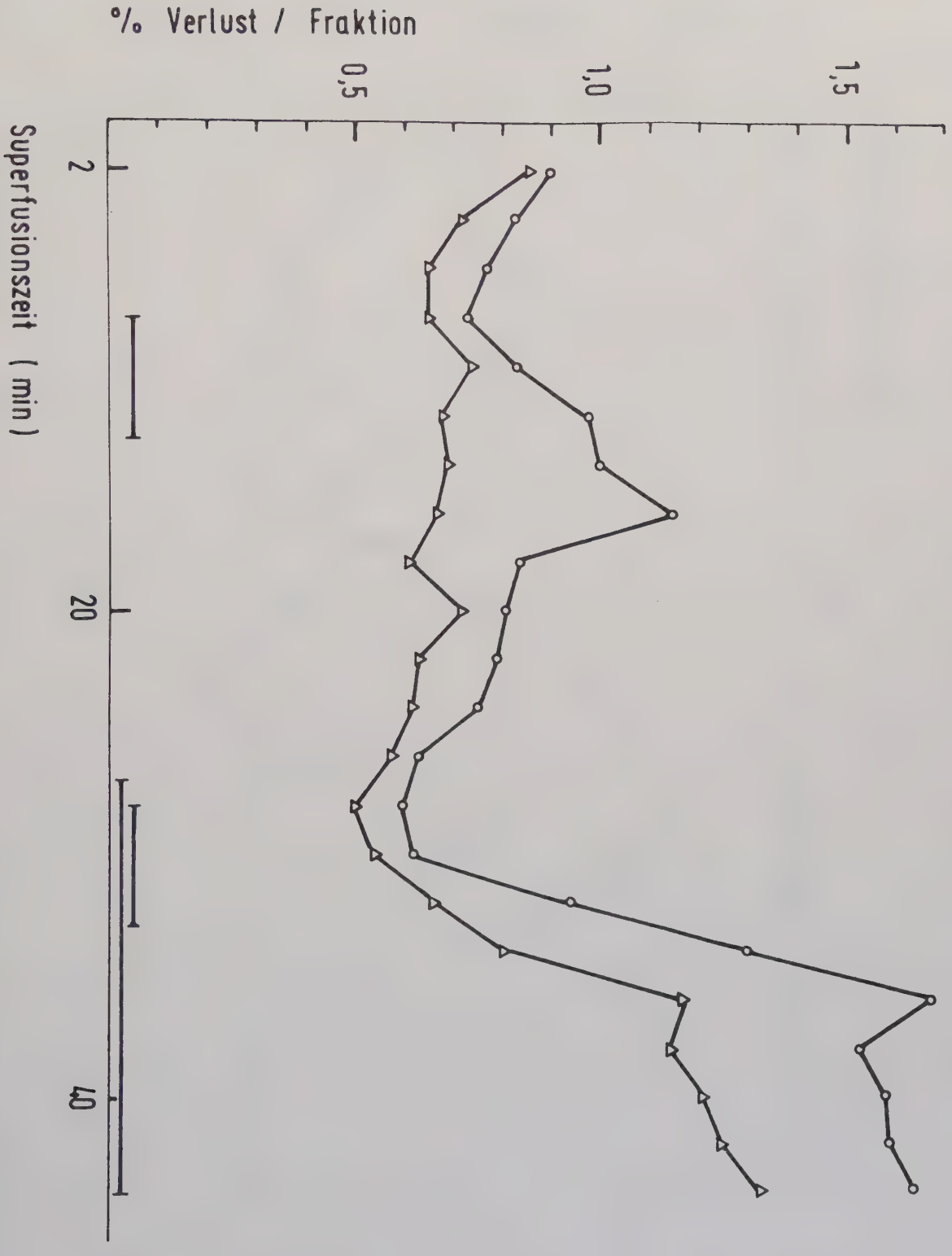

% Verlust / Fraktion
0,5
1,0
1,5
2
20
40
Superfusionszeit (min)
5x 10-5 M THN

Abb. 14g

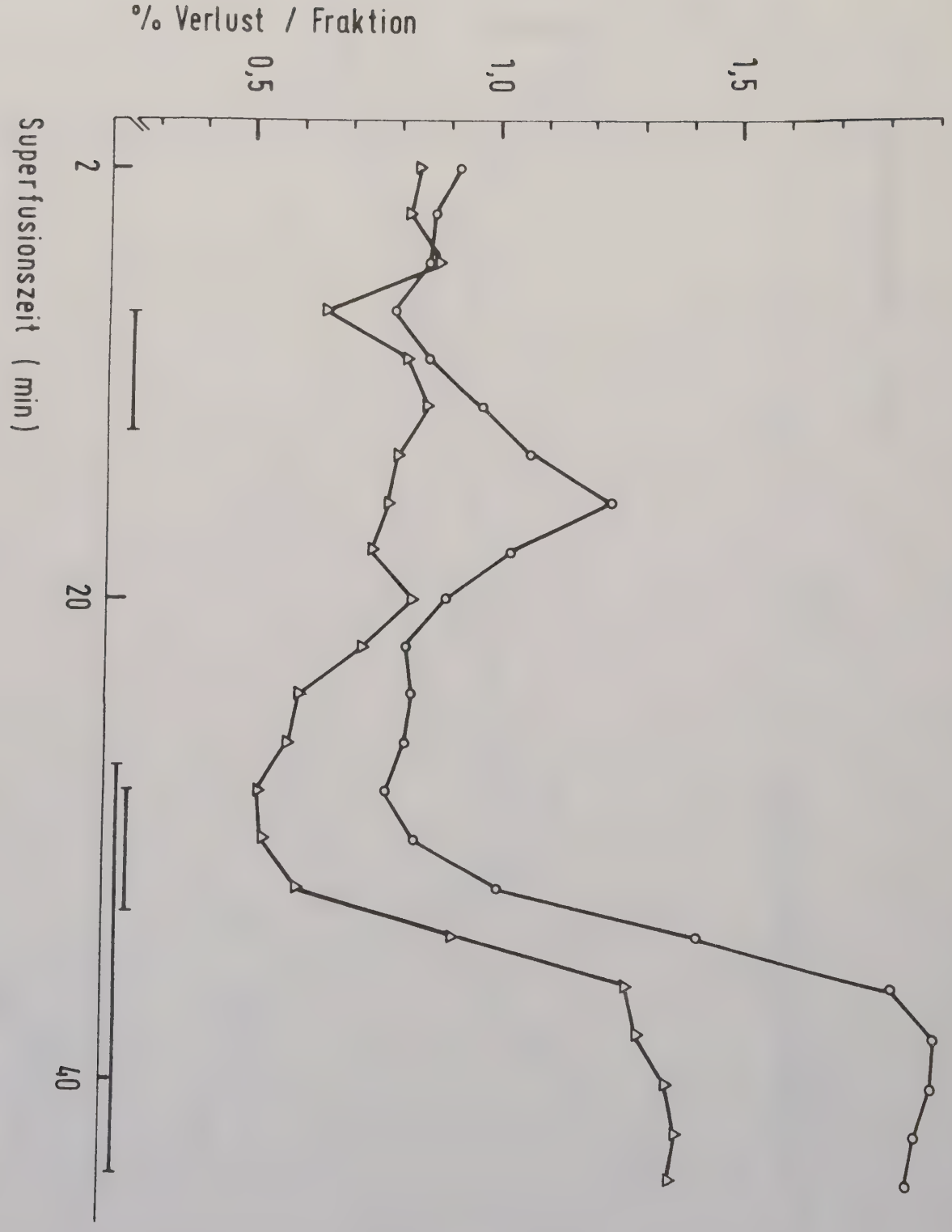

% Verlust / Fraktion
0,5
1,0
1,5
Superfusionszeit (min)
2
20
40
8 x 10-5 M THN

Abb. 14h

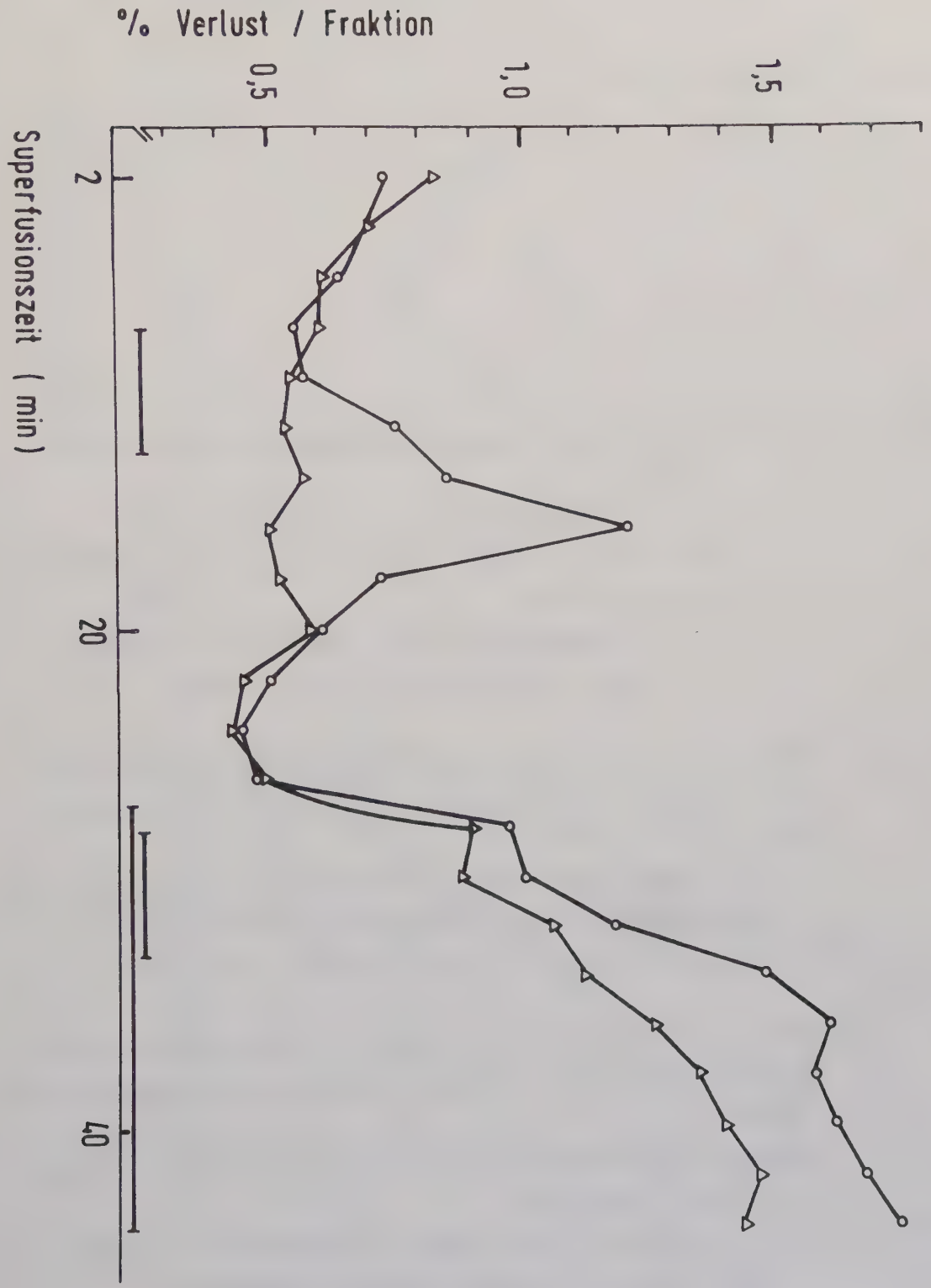

% Verlust / Fraktion
0,5
1,0
1,5
2
20
40
Superfusionszeit (min)
1 x 10-4 M THN

Abb. 15a und b: Zusammenstellung der Ergebnisse aus Abbildung 14, a-h.
Der Kurvenverlauf bis zur THN-Zugabe (27. Min.) zeigt den Mittelwert aus Abbildung 14 a-h.
⊢——⊣ Stimulation mit 31 mmol/l K^+ von der 8. - 13. und 28. - 33. Minute.

Abb. 15a: THN-Einfluß auf die K^+-induzierte ^3H-Ausschüttung aus Gewebeschnitten des Hypothalamus nach Markierung mit ^3H-5-HT
○—○ K^+-induzierte ^3H-Ausschüttung in Gegenwart von THN während der zweiten Stimulationsphase
●—● K^+-induzierte ^3H-Ausschüttung ohne THN

Abb. 15b: THN-Einfluß auf den spontanen ^3H-Ausstrom aus Gewebeschnitten des Hypothalamus nach Markierung mit ^3H-5-HT
Während der Phasen der K^+-Stimulation ist allein CGP 6085/A anwesend
△—△ spontaner ^3H-Ausstrom in Gegenwart von THN während der zweiten Stimulationsphase
▲—▲ spontaner ^3H-Ausstrom ohne THN

Abb. 15a

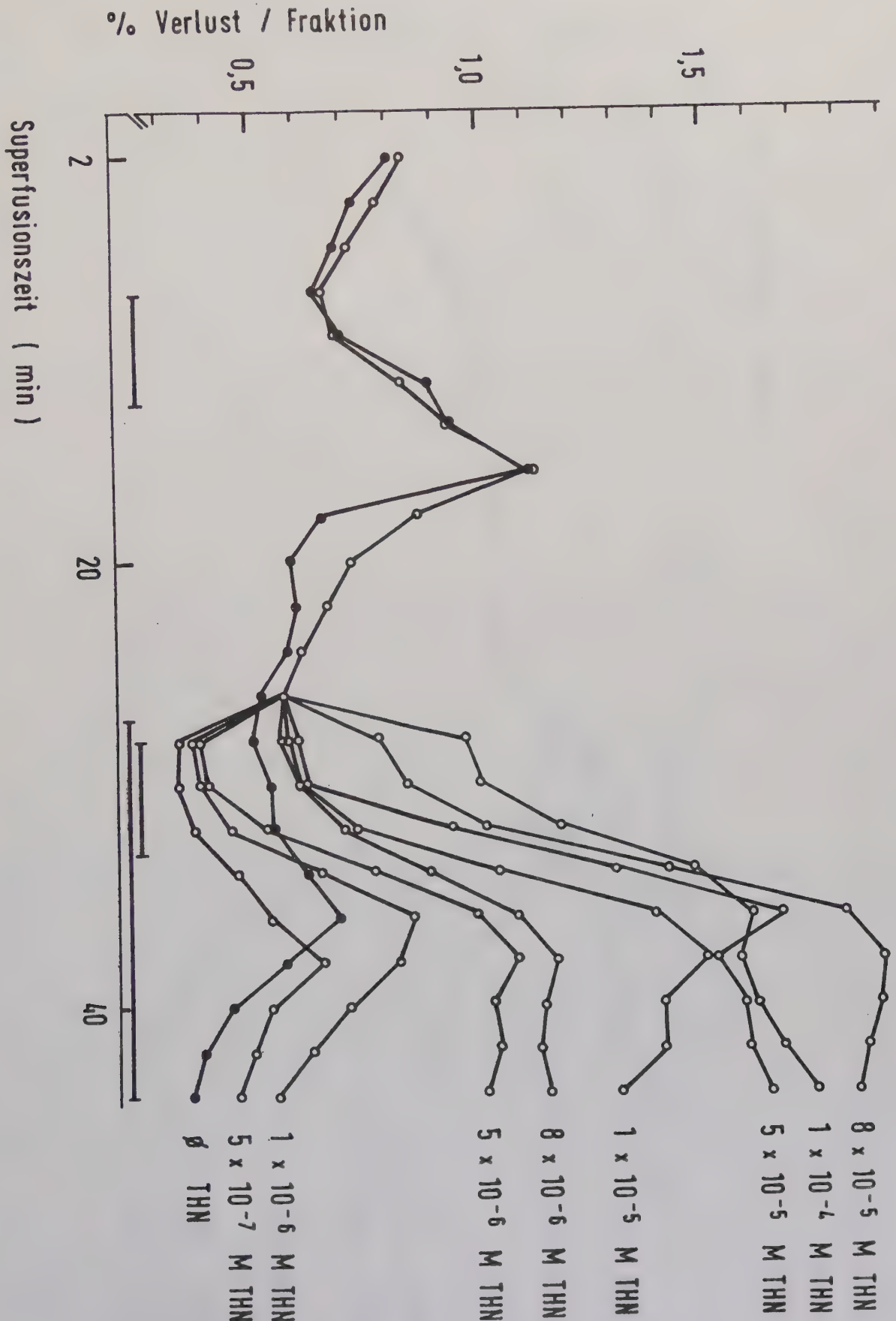

% Verlust / Fraktion
0,5
1,0
1,5
2
20
40
Superfusionszeit (min)
8 x 10-5 M THN
1 x 10-4 M THN
5 x 10-5 M THN
1 x 10-5 M THN
8 x 10-6 M THN
5 x 10-6 M THN
1 x 10-6 M THN
5 x 10-7 M THN
ø THN

Abb. 15b

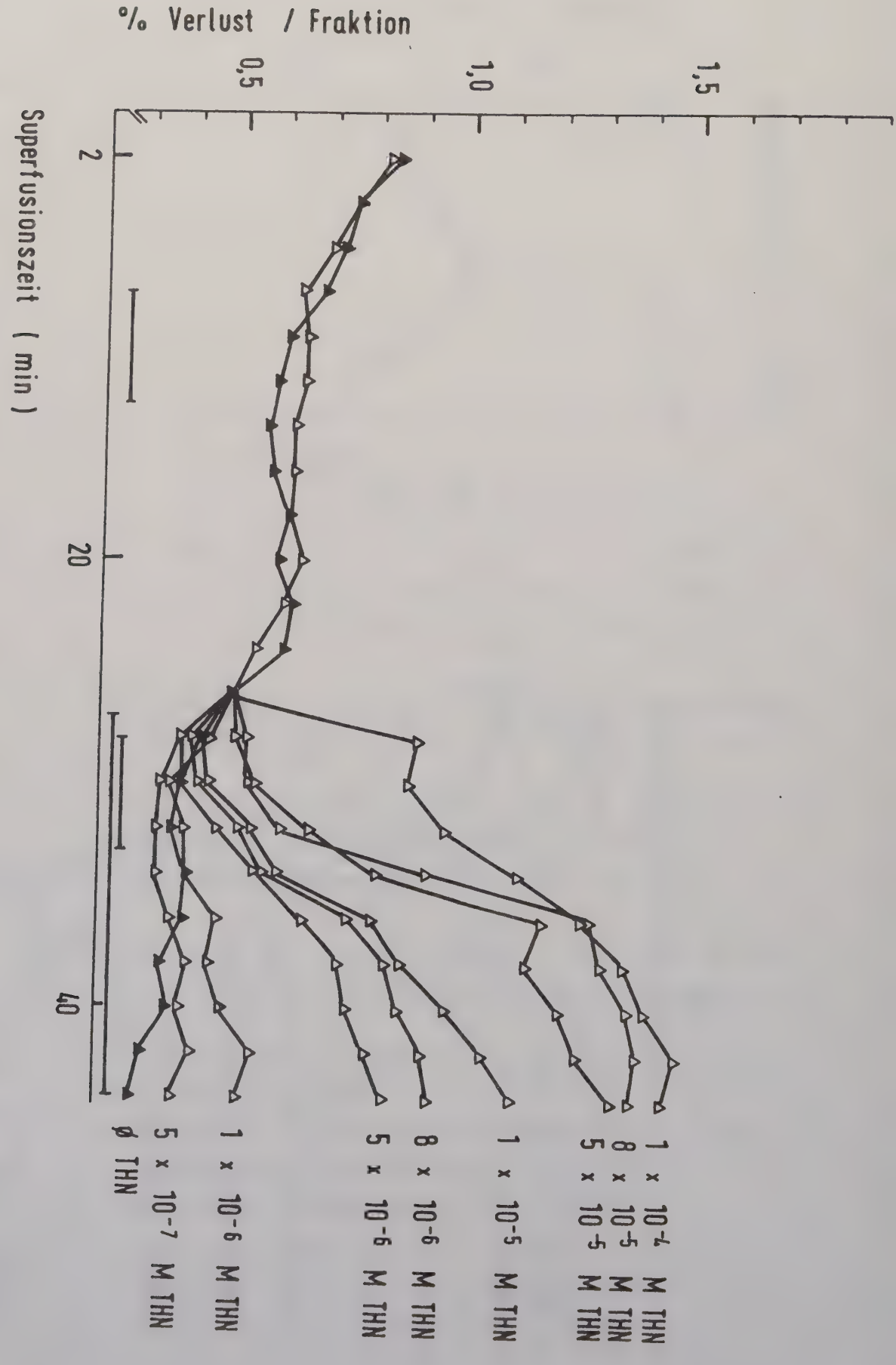

% Verlust / Fraktion
0,5
1,0
1,5
Superfusionszeit (min)
2
20
40
1 x 10-4 M THN
8 x 10-5 M THN
5 x 10-5 M THN
1 x 10-5 M THN
8 x 10-6 M THN
5 x 10-6 M THN
1 x 10-6 M THN
5 x 10-7 M THN
ø THN

Abb. 16a und b: Dosis-Wirkungs-Beziehung des THN-Einflusses auf die ^{3}H-5HT-Freisetzung.
Räumliche Darstellung der Ergebnisse aus Abbildung 14 a-h von der 28. - 44. min.

Abb. 16a: THN-Einfluß auf die K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung nach Markierung der Gewebeschnitte des Hypothalamus der Ratte mit ^{3}H-5-HT
○—○ K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung in Gegenwart von ansteigenden THN-Konzentrationen
●—● K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung ohne THN

Abb. 16b: THN-Einfluß auf den spontanen ^{3}H-Ausstrom nach Markierung der Gewebeschnitte des Hypothalamus der Ratte mit ^{3}H-5-HT
△—△ spontaner ^{3}H-Ausstrom in Gegenwart von ansteigenden THN-Konzentrationen
▲—▲ spontaner ^{3}H-Ausstrom ohne THN

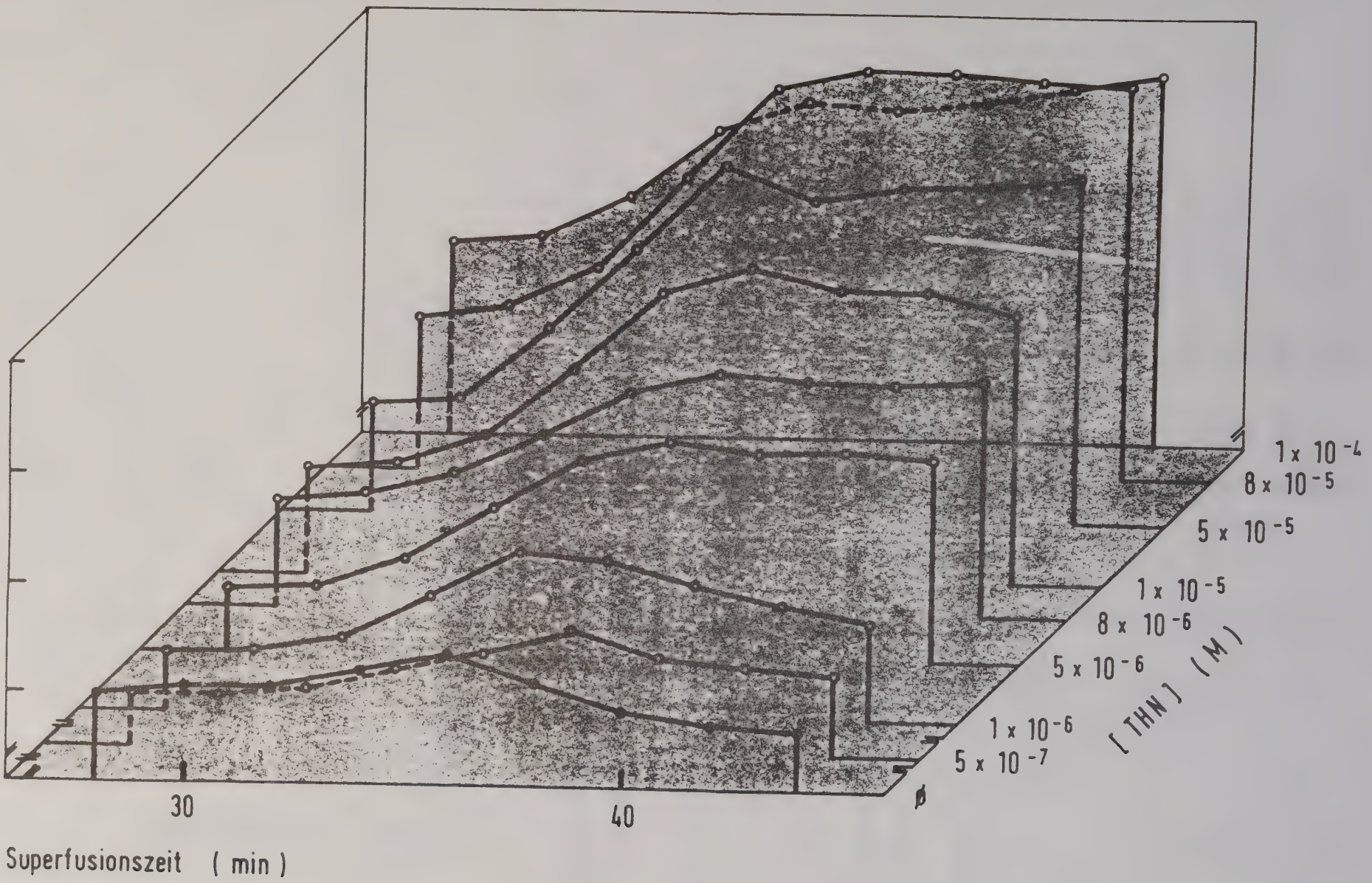

% Verlust / Fraktion
1,5
1,0
0,5
30
40
Superfusionszeit (min)
1 x 10 -4
8 x 10 -5
5 x 10 -5
1 x 10 -5
8 x 10 -6
5 x 10 -6
1 x 10 -6
5 x 10 -7
[THN] (M)
ø

Abb. 16a

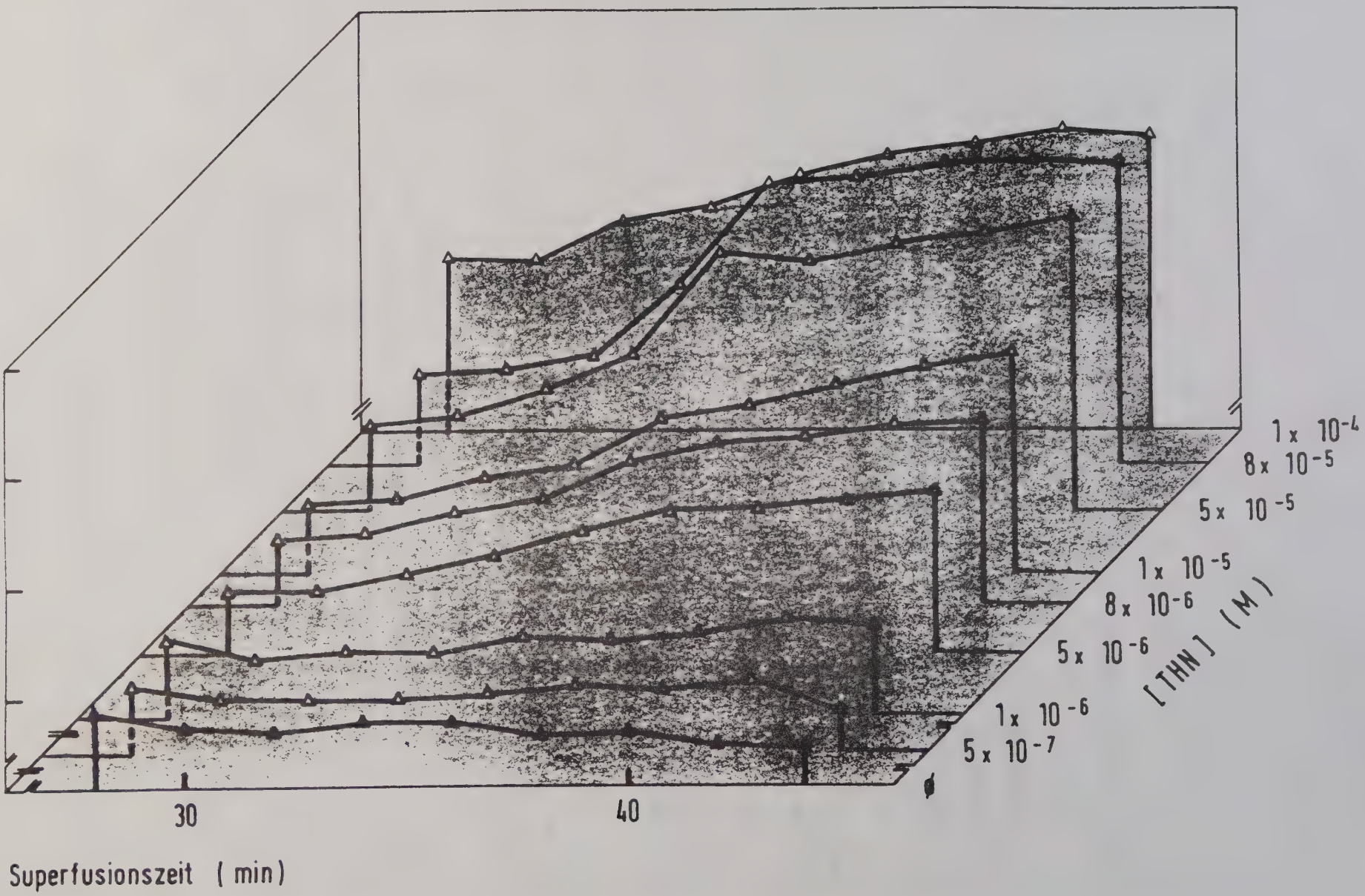

% Verlust / Fraktion
1,5
1,0
0,5
30
40
Superfusionszeit (min)
1 x 10-4
8 x 10-5
5 x 10-5
1 x 10-5
8 x 10-6
5 x 10-6
1 x 10-6
5 x 10-7
[THN] (M)

Abb. 16b

Tab. 3a und b: Planimetrierte Flächen des THN-Effekts auf die ^3H-Freisetzung (entsprechend der Abbildung 17).

S_1: planimetrierte Fläche der K^+-induzierten ^3H-Ausschüttung in Anwesenheit ansteigender THN-Konzentrationen von der 28. - 38. min.

S_2: planimetrierte Fläche der K^+-induzierten ^3H-Ausschüttung in Anwesenheit ansteigender THN-Konzentrationen von der 28. - 44. min.

S_3: planimetrierte Fläche des spontanen ^3H-Ausstroms in Anwesenheit ansteigender THN-Konzentrationen von der 28. - 38. min.

S_4: planimetrierte Fläche des spontanen ^3H-Ausstroms in Anwesenheit ansteigender THN-Konzentrationen von der 28. - 44. min.

$S_,$: K^+-induzierte ^3H-Ausschüttung und spontaner ^3H-Ausstrom des jeweils entsprechenden Zeitraumes ohne Zugabe von THN (schraffierte Fläche in Abbildung 17)

$S/S_,$: S_1 - S_4 jeweils dividiert durch den zugehörigen Wert ohne THN-Zugabe.

	THN-Konzentration (M)								
	ø(S,)	$5x10^{-7}$	$1x10^{-6}$	$5x10^{-6}$	$8x10^{-6}$	$1x10^{-5}$	$5x10^{-5}$	$8x10^{-5}$	$1x10^{-4}$
S_1	192	121	193	241	317	383	464	548	559
S_2	256	220	329	490	602	751	892	1057	1000
S_3	91	74	104	160	187	203	301	334	434
S_4	129	128	187	331	382	456	608	679	799

Tab. 3a:

[THN]	S_1/S_1, ●—●	S_2/S_2, ○—○	S_3/S_3, ▲—▲	S_4/S_4, △—△
ø	1	1	1	1
$5x10^{-7}$	0,63	0,86	0,81	0,99
$1x10^{-6}$	1,01	1,29	1,14	1,45
$5x10^{-6}$	1,26	1,91	1,76	2,57
$8x10^{-6}$	1,65	2,35	2,05	2,96
$1x10^{-5}$	1,99	2,93	2,23	3,53
$5x10^{-5}$	2,42	3,48	3,31	4,71
$8x10^{-5}$	2,85	4,13	3,67	5,26
$1x10^{-4}$	2,91	3,91	4,77	6,19

Tab. 3b:

Abb. 17 (Verkleinerung von Abb. 15a und b)

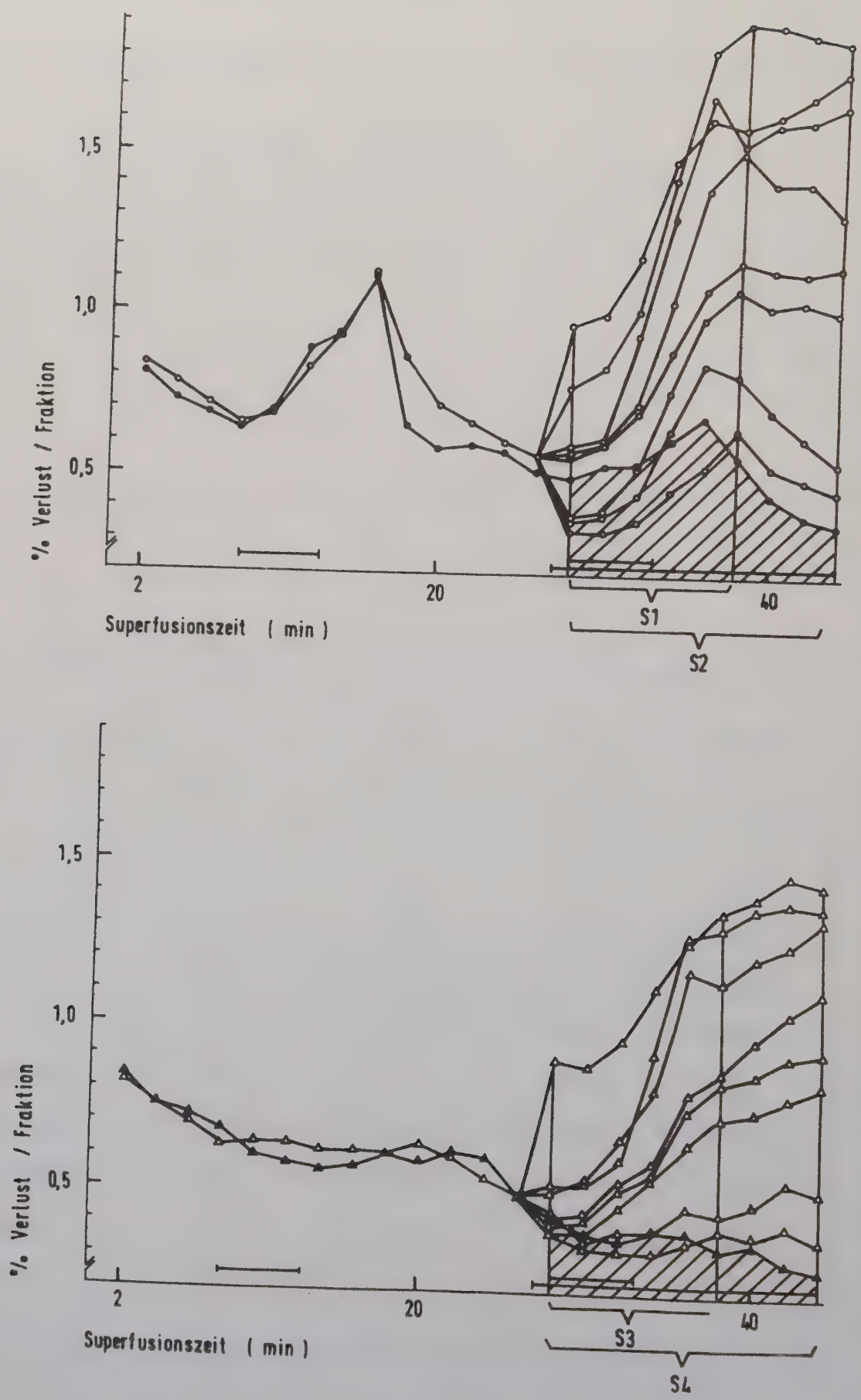


Abb. 18: Dosis-Wirkungs-Kurven des THN-Effekts auf die ^3H-Freisetzung

●—● S_1/S_1, THN-Effekt auf die K^+-induzierte ^3H-Ausschüttung von der 28. bis zur 38. min., bezogen auf die entsprechende K^+-induzierte ^3H-Ausschüttung ohne THN.

o—o S_2/S_2, THN-Effekt auf die K^+-induzierte ^3H-Ausschüttung von der 28. bis zur 44. min., bezogen auf die entsprechende K^+-induzierte ^3H-Ausschüttung ohne THN

▲—▲ S_3/S_3, THN-Effekt auf den spontanen ^3H-Ausstrom von der 28. bis zur 38. min., bezogen auf den entsprechenden spontanen ^3H-Ausstrom ohne THN

△—△ S_4/S_4, THN-Effekt auf den spontanen ^3H-Ausstrom von der 28. bis zur 44. min., bezogen auf den entsprechenden spontanen ^3H-Ausstrom ohne THN

1
2
3
4
5
X
ø
5 x 10 -7
1 x 10-6
5 x 10-6
8 x 10- 6
1 x 10-5
5 x 10-5
8 x 10-5
1 x 10-4
[THN]
S1/S1.
S2/S2.
S3/S3.

DI3. Abhängigkeit des THN-Effektes von der Ca^{++}-Konzentration

Es stellte sich die Frage, über welche Mechanismen THN die ^3H-Freisetzung moduliert. In der Anwesenheit von Calciumionen wird eine notwendige Voraussetzung für die spezifische Ausschüttung durch Exocytose gesehen (VARGAS & ORREGO, 1976). Auch im Rahmen der negativen Feedback-Kontrolle über die präsynaptischen Rezeptoren wird die Anwesenheit Ca^{++}-sensitiver Kanäle vorausgesetzt (RAITERI et al., 1979).

Aus den Abbildungen 19a und b kann abgeleitet werden, daß der stimulierende Effekt von THN auf die K^+-induzierte Ausschüttung wie auf den spontanen Ausstrom von 5-HT Ca^{++}-abhängig ist. Das obere Kurvenpaar (Abb. 19a) zeigt den Einfluß von 8×10^{-6} M THN in Gegenwart von 2,54 mM Ca^{++} im üblichen KRB-Puffer auf die ^3H-Freisetzung. Unter entsprechenden experimentellen Bedingungen, aber Ca^{++}-freiem KRB-Puffer, ist die THN-Stimulation auf die ^3H-Freisetzung nicht mehr nachweisbar (unteres Kurvenpaar, Abb. 19a). Inwieweit es sich noch um einen signifikanten THN-Effekt gegen Ende der Sammelperiode handelt muß offenbleiben. Deutlicher wird dieser Effekt im Vergleich zu der Kurve in Abbildung 19b (■—■), die mit Ca^{++}- und THN-freiem Superfusionsmedium erzielt wurde.

Die THN-Wirkung auf den spontanen ^3H-Ausstrom ist von Interesse, da sich unter diesen Bedingungen eine mögliche Wirkung über die Na^+-K^+-aktivierbare ATPase nachweisen ließe.

Zusammenfassend bleibt zu diskutieren, ob THN mit diesem Wirkungsmuster die Eigenschaften eines zentralen Neuromodulators aufweist.

Abb. 19a und b: Einfluß von Calcium auf die modulierende THN-Wirkung.
Am Beispiel der THN-Konzentration von 8×10^{-6} M (vergl. Abb. 14d)
Markierung der Gewebeschnitte des Hypothalamus der Ratte mit $2,5 \times 10^{-7}$ M ^{3}H-5-HT für 10 min. bei 37°C
⊢——⊣ Stimulation mit 31 mmol/l K^{+} von der 8. - 13. und 28. - 23. min.

Abb. 19a: Das obere Kurvenpaar zeigt die THN-Wirkung auf die K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung und den spontanen ^{3}H-Ausstrom in Gegenwart von 2,54 mM Ca^{++}
o—o mit K^{+}-induzierter Depolarisation (n=4)
Δ—Δ ohne K^{+}-induzierte Depolarisation (n=3)
Das untere Kurvenpaar zeigt die THN-Wirkung auf die K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung und den spontanen ^{3}H-Ausstrom in Abwesenheit von Ca^{++}
●—● mit K^{+}-induzierter Depolarisation (n=6)
▲—▲ ohne K^{+}-induzierte Depolarisation (n=4)

Abb. 19b: Die obere Kurve zeigt in Abwesenheit von Ca^{++} und THN die K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung
■—■ mit K^{+}-induzierter Depolarisation (n=6)
Das untere Kurvenpaar entspricht dem auf Abb. 19

Abb. 19a

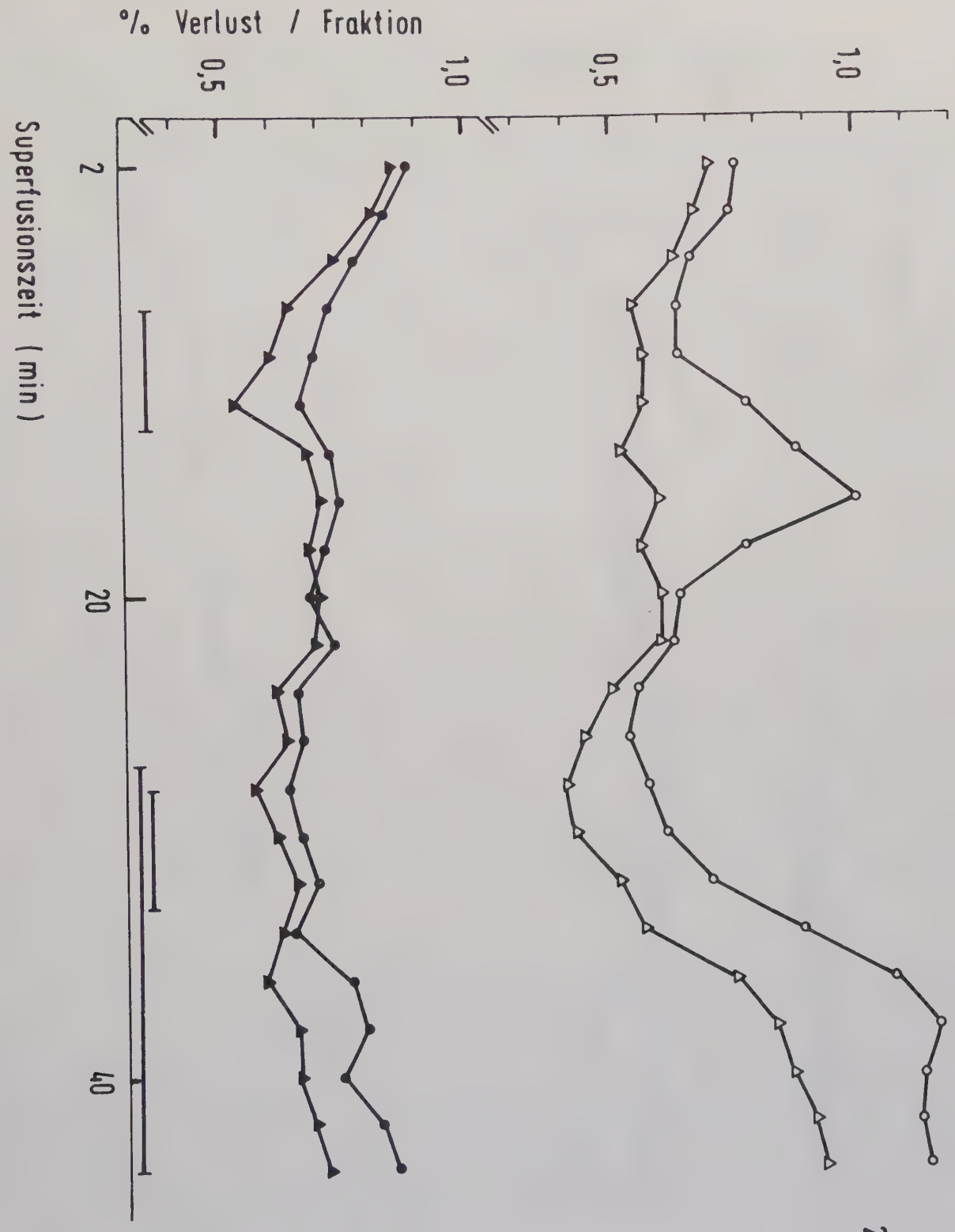
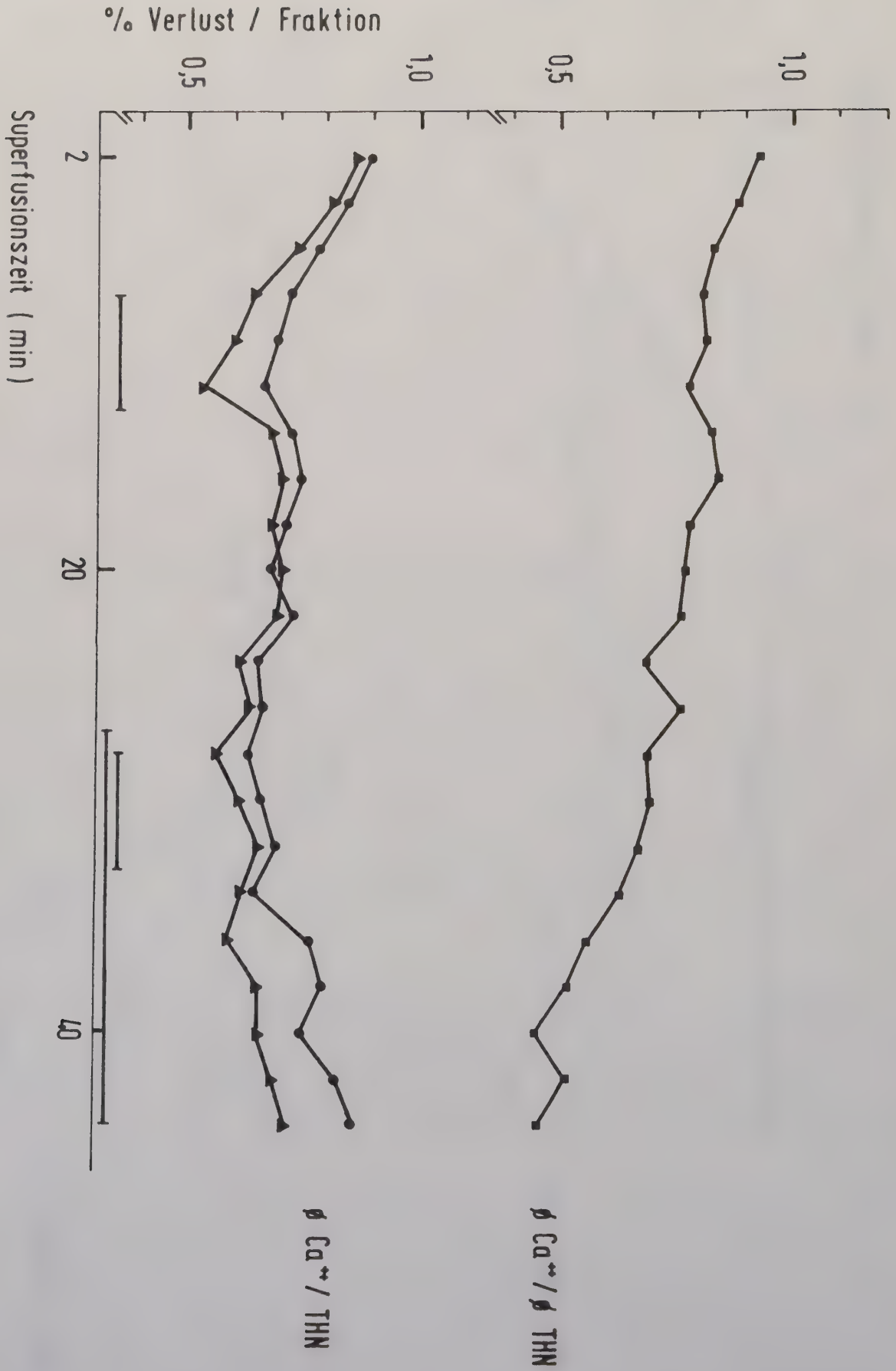

% Verlust / Fraktion
0,5
1,0
0,5
1,0
2
20
40
Superfusionszeit (min)
2,54 mM Ca++ / THN
ø Ca++ / THN

Abb. 19b


% Verlust / Fraktion
0,5
1,0
0,5
1,0
2
20
40
Superfusionszeit (min)
ø Ca++/ THN
ø Ca++/ø THN

D II. SPEZIFISCHE AUSSCHÜTTUNG VON THN

Die THN-Wirkungen, die in pharmakologischen Tests beobachtet wurden (ROMMELSPACHER et al., 1977), können auf einem modulierenden Effekt auf serotonerge Mechanismen beruhen. Darüber hinaus bleibt zu untersuchen, inwieweit THN selbst als Transmitter wirksam ist. Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob THN selbst spezifisch ausgeschüttet wird. Dabei geht es um die Frage, ob THN durch K^+-Stimulierung ausschüttbar ist und wenn ja, welche Voraussetzungen für die Ausschüttung gegeben sein müssen.

D II 1. Vorversuche nach Inkubation mit ^{14}C-THN

Zunächst wurden die Versuchsbedingungen untersucht, die zu einer möglichst spezifischen Markierung der Neurone führen. Das heißt eine artefizielle Aufnahme in andere als Nervenzellen sollte vermieden werden. Während der anschließenden Superfusion wurde untersucht, ob die radioaktiv markierte Substanz durch hohe K^+-Konzentrationen spezifisch ausgeschüttet wird. Dieser Effekt wurde gemessen an der ^{14}C-Freisetzung.

D II 1 a. ^{14}C-Freisetzung in Abhängigkeit von der ^{14}C-THN-Konzentration während der Inkubation

Die Gewebeschnitte des Hypothalamus der Ratte wurden für 20 Minuten bei 37°C mit ansteigenden THN-Konzentrationen inkubiert. Während der anschließenden Superfusion wurde zweimalig mit 31 mmol/l K^+ stimuliert in Gegenwart von CGP 6085/A, und zwar von der 8. bis zur 13. Minute und von der 28. bis zur 33. Minute. Nach Inkubation mit 8×10^{-5} M ^{14}C-THN tritt

keine deutliche K^+-induzierte ^{14}C-THN-Ausschüttung auf (Abb. 20a). Dieser Effekt ist erst ab einer erhöhten ^{14}C-THN-Konzentration von $1,5 \times 10^{-4}$ M nachweisbar (Abb. 20b) und steigt mit einer höheren Konzentration von 3×10^{-4} M ^{14}C-THN noch weiter an (Abb. 20c). Der Kurvenverlauf erreicht dabei sein Stimulationsmaximum 4 Minuten nach Beginn der K^+-induzierten Depolarisation und kehrt nach weiteren 6 - 8 Minuten zur Basislinie zurück. Die zweite Stimulationsperiode führt in der Regel zu einem schwächeren Effekt als die erste. Dieses Ausschüttungsmuster entspricht der ^3H-5HT-Freisetzung (vergl. S.40). Die Kurven sind jeweils bezogen auf den spontanen ^{14}C-THN-Ausstrom, der ohne K^+-Stimulation nur in Gegenwart von CGP 6085/A meßbar ist. CGP 6085/A hat als Hemmstoff der spezifischen Wiederaufnahme auf die ^{14}C-THN-Freisetzung ebenfalls keinen Effekt. In Abbildung 20d sind die Ergebnisse zum übersichtlichen Vergleich zusammengefaßt.

Die vergleichsweise hohen Konzentrationen des eingesetzten THN sind bedingt durch die geringe spezifische Aktivität des ^{14}C-markierten THN. Es wäre also denkbar, daß bei Anwendung einer höher spezifisch markierten Substanz die Effekte auch bei wesentlich niedrigerer Konzentration nachweisbar sind.

Abb. 20a-d: Einfluß ansteigender THN-Konzentrationen auf die ^{14}C-Freisetzung

Markierung der Gewebeschnitte des Hypothalamus der Ratte mit ^{14}C-THN für 20 min. bei 37°C

⟷ Stimulation mit 31 mmol/l K^+ von der 8. - 13. und 28. - 33. min.

Abb. 20a zeigt die K^+-stimulierte ^{14}C-Ausschüttung nach Inkubation der Gewebepräparation mit 8 x 10^{-5} M ^{14}C-THN

o—o mit K^+-induzierter Depolarisation (n=8)

Δ—Δ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=4)

Abb. 20b zeigt die K^+-stimulierte ^{14}C-Ausschüttung nach Inkubation der Gewebepräparation mit 1,5 x 10^{-4} M ^{14}C-THN

o—o mit K^+-induzierter Depolarisation (n=8)

Δ—Δ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=2)

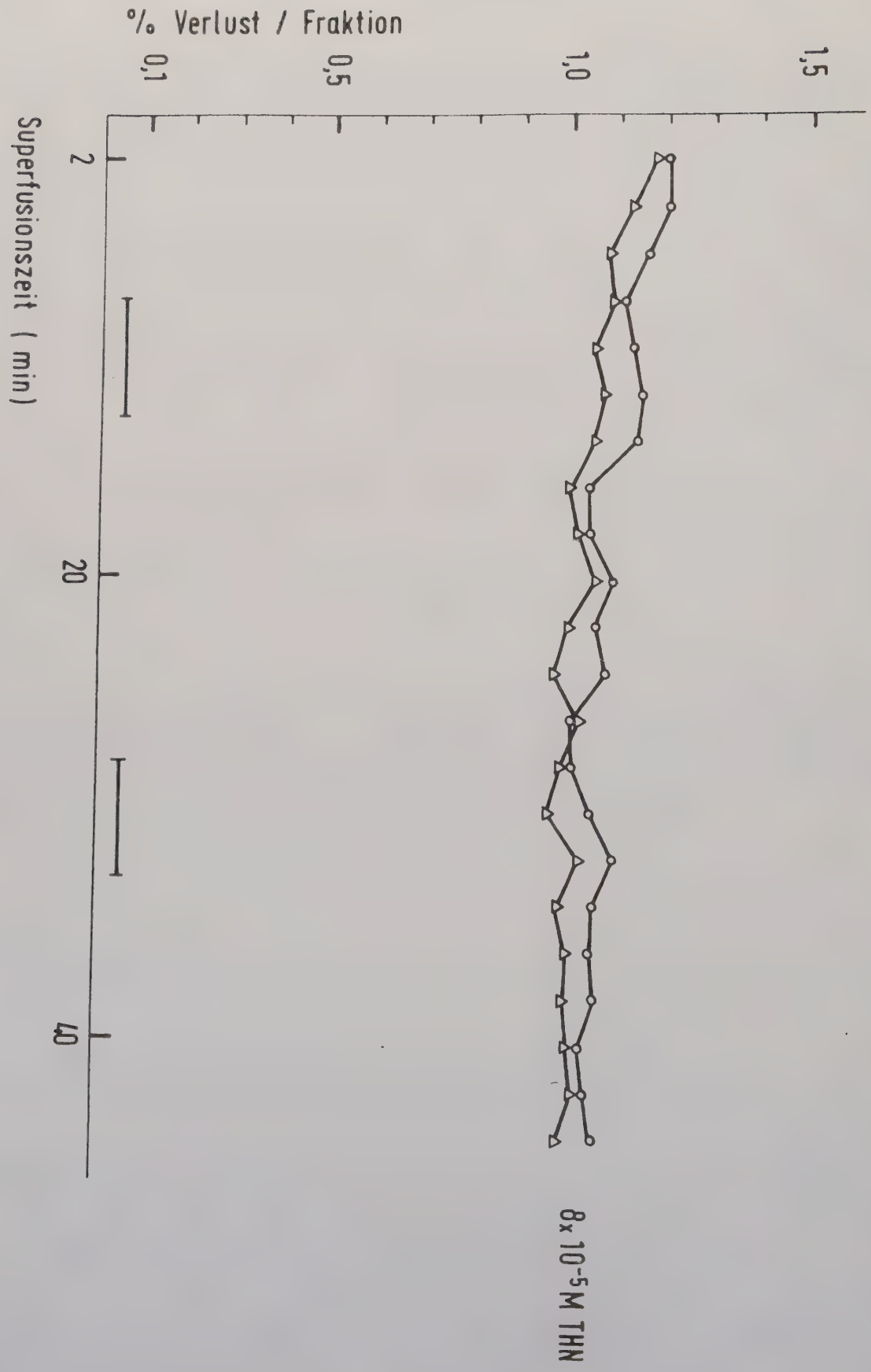
Abb. 20c zeigt die K^+-stimulierte ^{14}C-Ausschüttung nach Inkubation der Gewebepräparation mit 3 x 10^{-4} M ^{14}C-THN

o—o mit K^+-induzierter Depolarisation (n=6)

Δ—Δ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=3)

Abb. 20d Zusammenstellung der Ergebnisse aus Abb. 20a-c jeweils bezogen auf den spontanen ^{14}C-Ausstrom. Dabei ist während der Stimulationsphasen mit hohen K^+-Konzentrationen CGP 6085/A anwesend.

Abb. 20a


% Verlust / Fraktion
0,1
0,5
1,0
1,5
Superfusionszeit (min)
2
20
40
8 x 10-5M THN

'bb. 20b

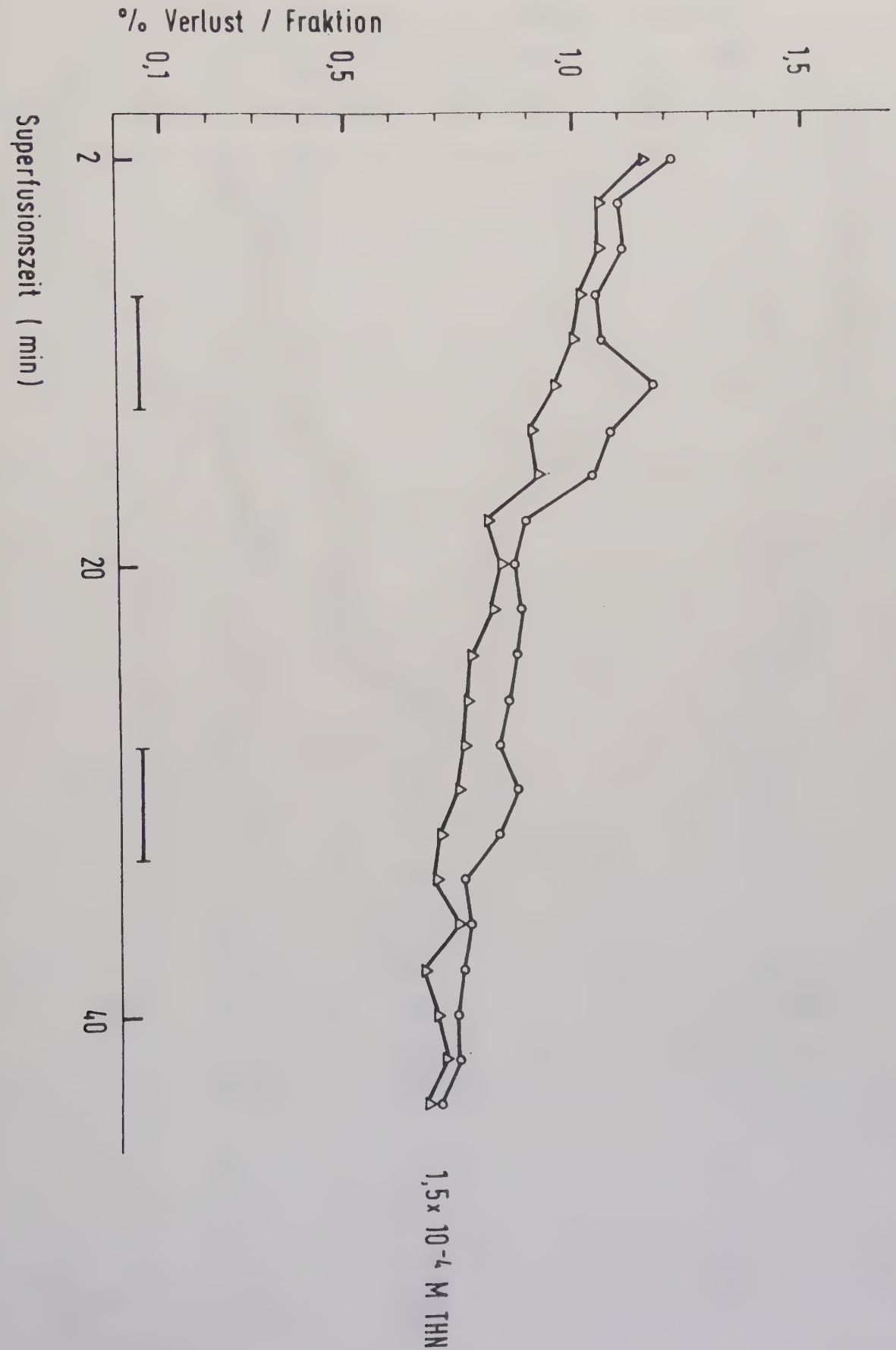

% Verlust / Fraktion
0,1
0,5
1,0
1,5
2
20
40
Superfusionszeit (min)
1,5 x 10-4 M THN

Abb. 20c

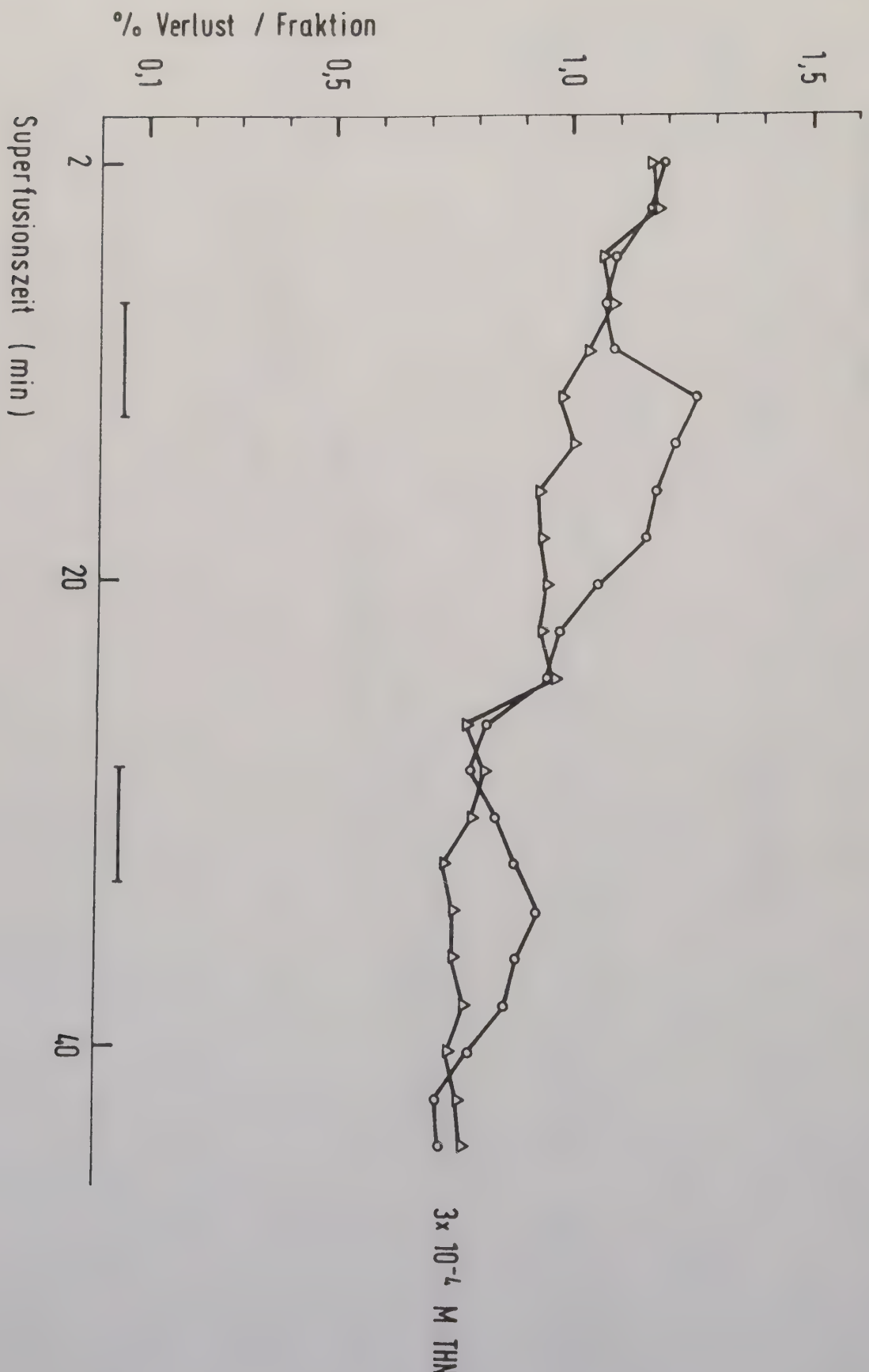
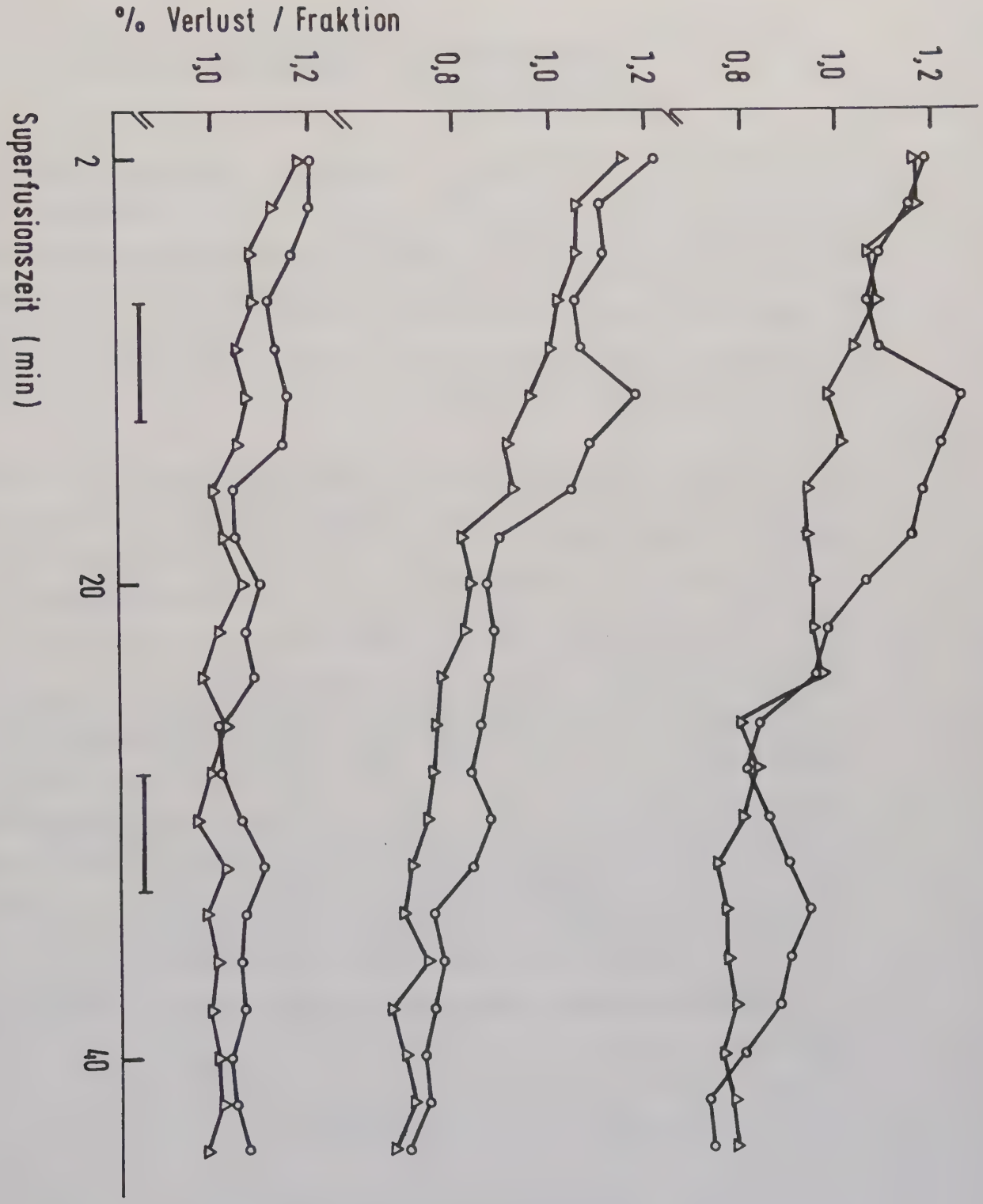

% Verlust / Fraktion
0,1
0,5
1,0
1,5
Superfusionszeit (min)
2
20
40
3x 10⁻⁴ M THN

Abb. 20d


% Verlust / Fraktion
1,2
1,0
0,8
1,2
1,0
1,2
Superfusionszeit (min)
2
20
40
3x10⁻⁴ M THN
1,5x10⁻⁴ M THN
8x10⁻⁵ M THN

D II 1 b. ^{14}C-Freisetzung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Für die folgenden Versuche wurde die niedrigste THN-Konzentration gewählt, die noch zu einem deutlich meßbaren Ergebnis führt. Als nächstes wurde eine möglichst kurze Inkubationszeit untersucht, die zu einem deutlich nachweisbaren Effekt bei der anschließenden ^{14}C-Freisetzung führt. Dazu wurden die Gewebeschnitte des Hypothalamus mit $1,5 \times 10^{-4}$ M ^{14}C-THN bei 37°C inkubiert.

Die K^+-induzierte ^{14}C-Freisetzung wurde nach 10, 20 und 30-minütiger Inkubationsdauer untersucht. Die K^+-Stimulation erfolgt wieder durch Erhöhung der K^+-Konzentration von 6 auf 31 mmol/l in Gegenwart von CGP 6085/A während der 8. bis zur 13. und 28. bis zur 33. Minute.

Nach 10minütiger Inkubation mit ^{14}C-THN ist ein geringer Anstieg der ^{14}C-Freisetzung durch hohe K^+-Konzentration nachweisbar (abb. 21a). Der Effekt ist nach 20minütiger Inkubation deutlicher (Abb. 21b) und steigt nach 30minütiger Inkubation noch weiter an (Abb. 21c). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 21d zusammengefaßt jeweils bezogen auf den zugehörigen spontanen ^{14}C-Ausstrom. Beim spontanen ^{14}C-Ausstrom war während der zweimaligen Stimulationsphase allein CGP 6085/A anwesend, das keinen Effekt auf die ^{14}C-Freisetzung zeigt.

Abb. 21a-d: Einfluß zunehmender Inkubationszeit auf die ^{14}C-Freisetzung

Markierung der Gewebeschnitte des Hypothalamus der Ratte mit 1,5 x 10^{-4} M ^{14}C-THN bei 37°C

⊢—⊣ Stimulation mit 31 mmol/l K^+ von der 8. - 13. und 28. - 33. min.

Abb. 21a zeigt die K^+-stimulierte ^{14}C-Ausschüttung nach 10minütiger Inkubation der Gewebepräparation
o—o mit K^+-induzierter Depolarisation (n=6)
Δ—Δ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=4)

Abb. 21b zeigt die K^+-stimulierte ^{14}C-Ausschüttung nach 20minütiger Inkubation der Gewebepräparation
o—o mit K^+-induzierter Depolarisation (n=8)
Δ—Δ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=2)

Abb. 21c zeigt die K^+-stimulierte ^{14}C-Ausschüttung nach 30minütiger Inkubation der Gewebepräparation
o—o mit K^+-induzierter Depolarisation (n=8)
Δ—Δ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=4)

Abb. 21d Zusammenstellung der Ergebnisse aus Abbildung 21a-c jeweils bezogen auf den spontanen ^{14}C-Ausstrom. Während der Stimulationsphasen mit hohen K^+-Konzentrationen ist CGP 6085/A anwesend.

Abb. 21a

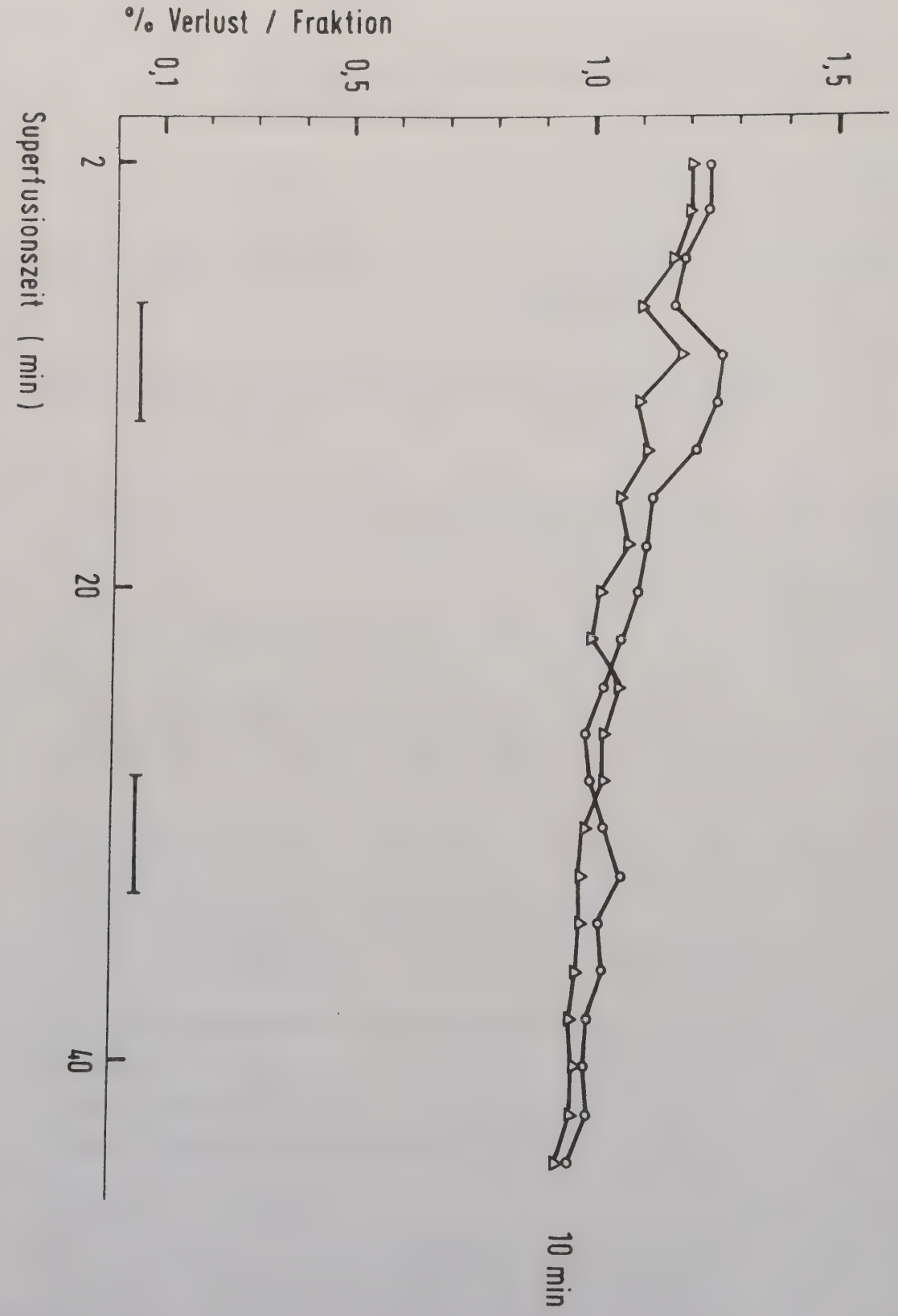

% Verlust / Fraktion
0,1
0,5
1,0
1,5
Superfusionszeit (min)
2
20
40
10 min

Abb. 21b

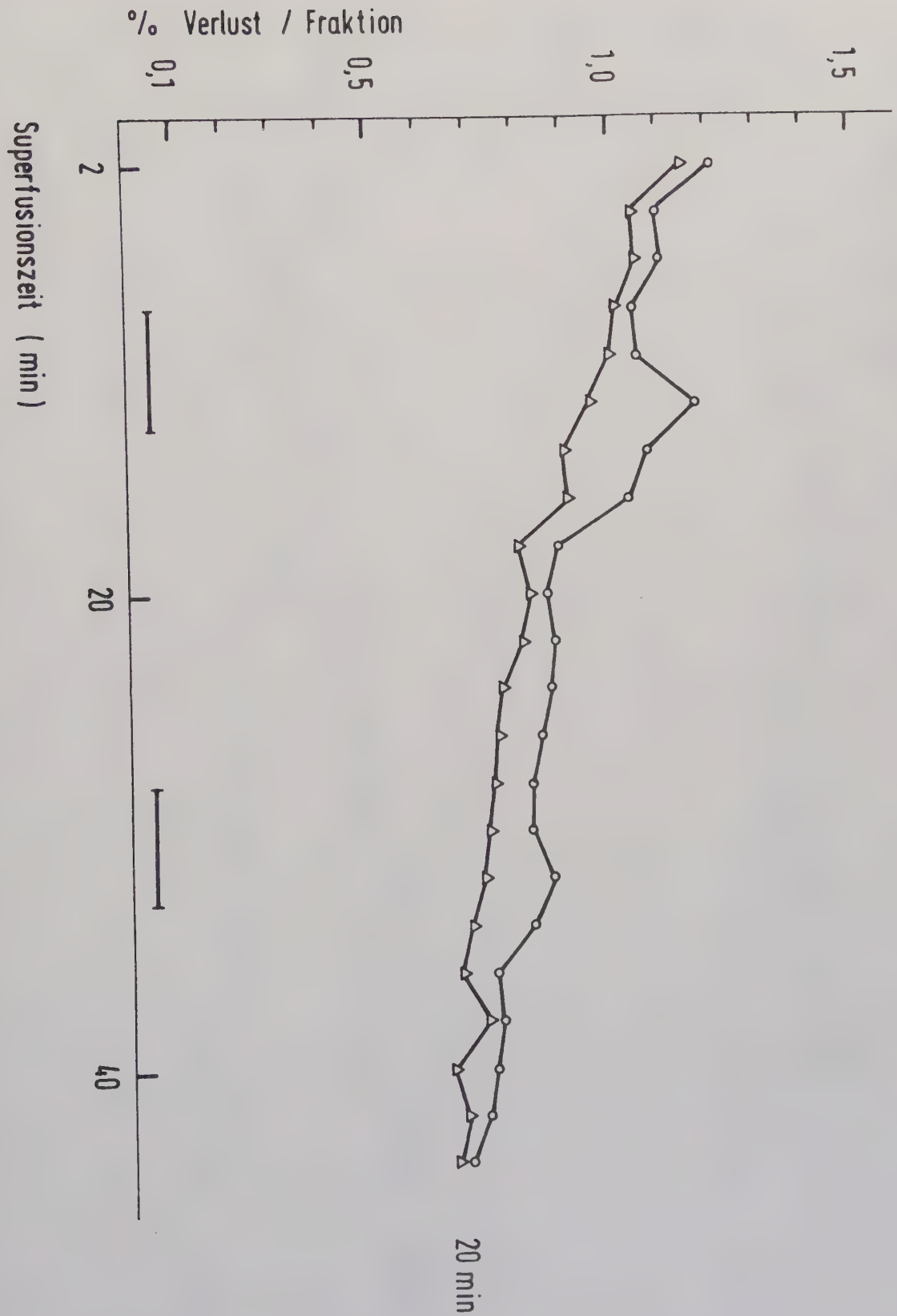

% Verlust / Fraktion
0,1
0,5
1,0
1,5
Superfusionszeit (min)
2
20
40
20 min

Abb. 21c

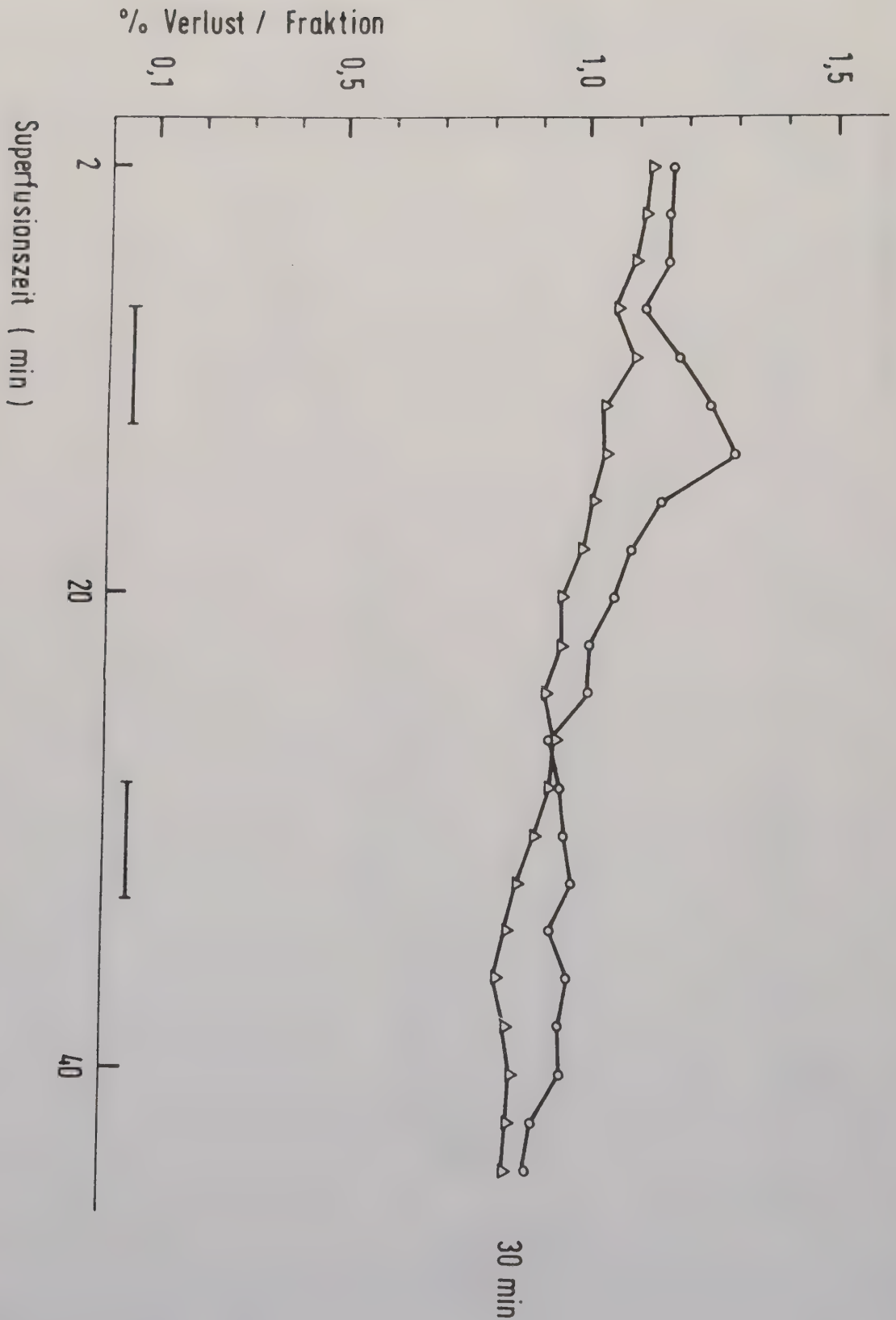
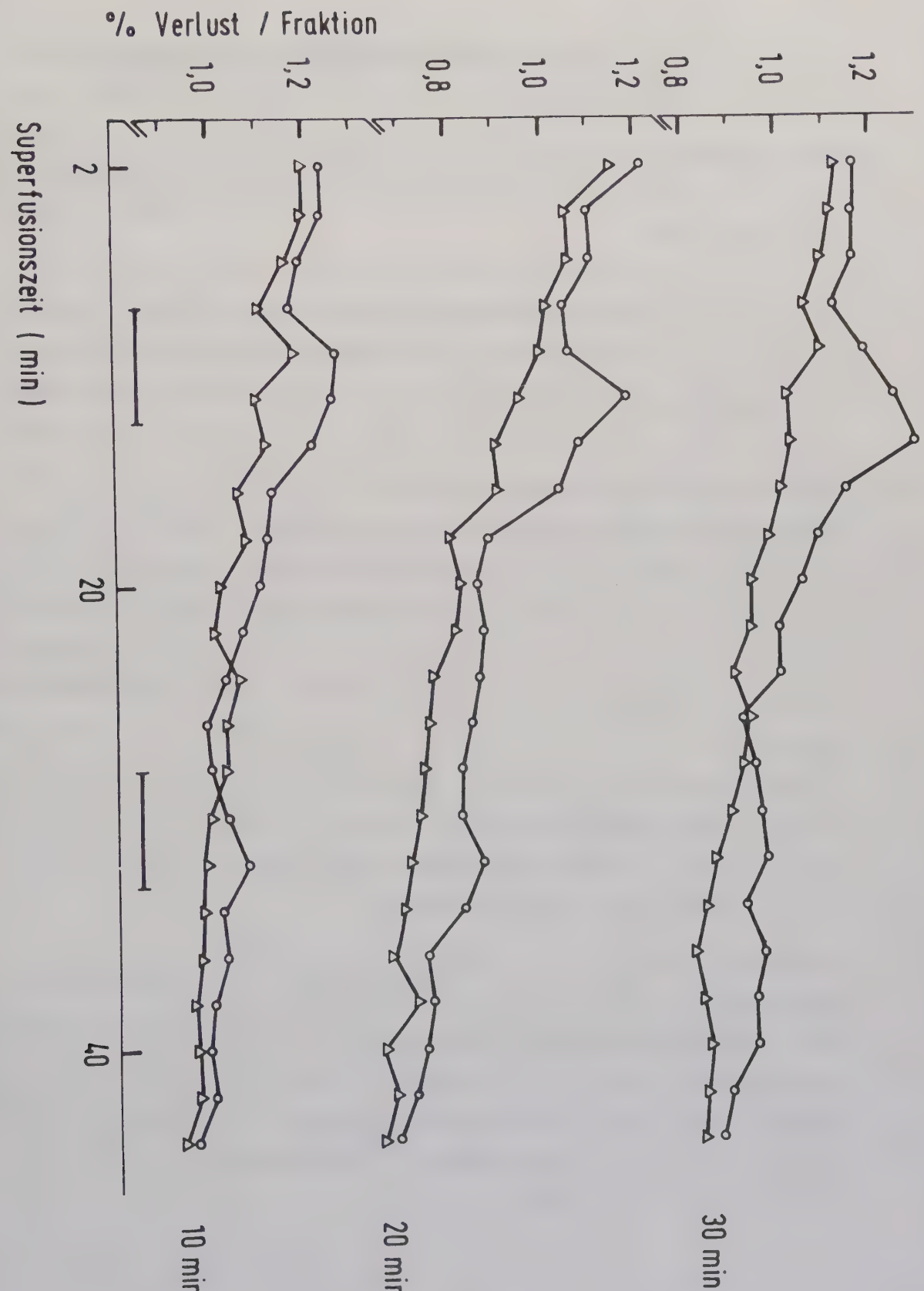

% Verlust / Fraktion
0,1
0,5
1,0
1,5
Superfusionszeit (min)
2
20
40
30 min

Abb. 21d


% Verlust / Fraktion
1,2
1,0
0,8
1,2
1,0
1,2
1,0
2
20
40
Superfusionszeit (min)
30 min
20 min
10 min

D II 2. ^{14}C-Freisetzung in Abhängigkeit von der Ca^{++}-Konzentration

Mit den folgenden Experimenten wurde die Frage untersucht, ob THN in Abhängigkeit von der Ca^{++}-Konzentration ausgeschüttet wird.

Wird die Plasmamembran des Neurons depolarisiert, fließt extrazelluläres Calcium durch spezialisierte Strukturen, sogenannte Erregungs-sensitive Ca^{++}-Kanäle, in das Cytoplasma. Die treibende Kraft für diesen Einstrom ist die große Differenz der Calciumionen-Konzentration zwischen extrazellulärer Flüssigkeit und Cytoplasma sowie das elektrische Membranpotential. Die Zunahme der Ca^{++}-Konzentration im Cytoplasma gilt als direkter Stimulus für die spezifische Transmitterausschüttung durch Exocytose (BLAUSTEIN, 1975).

Wir untersuchten die Ca^{++}-Abhängigkeit der ^{14}C-Freisetzung in dem Konzentrationsbereich von 0 - 2,54 mM Ca^{++}. Zunächst wurden die Gewebeschnitte des Hypothalamus mit 3×10^{-4} M ^{14}C-THN für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Diese vergleichsweise hohe THN-Konzentration wurde gewählt, da die entsprechend hohe ^{14}C-Freisetzung die Abhängigkeit von der Ca^{++}-Konzentration deutlicher macht.

Abbildung 22a zeigt die K^+-induzierte ^{14}C-Freisetzung in Anwesenheit von 2,54 mM Ca^{++}. Diese Konzentration entspricht der Zusammensetzung des KRB-Puffers. Herabsetzung der Ca^{++}-Konzentration auf 1,27 mM führt zu einer deutlichen Verminderung der ^{14}C-Freisetzung (Abb. 22b). In Abwesenheit von Calcium ist die K^+-induzierte ^{14}C-Freisetzung nicht mehr nachweisbar (Abb. 22c).

In allen Experimenten war die jeweilige Ca^{++}-Konzentration schon während der Inkubation im Medium vorhanden und wurde während aller weiteren Schritte beibehalten, bzw. war schon der Inkubationsansatz Calcium-frei, wie alle weiter verwendeten Lösungen.

In Abbildung 22d sind diese Befunde zusammengefaßt, jeweils bezogen auf den zugehörigen spontanen ^{14}C-THN-Ausstrom, der durch variierte Ca^{++}-Konzentrationen nicht beeinflußt wird. Dabei wird deutlich, daß die K^{+}-induzierte ^{14}C-THN-Ausschüttung nur in Anwesenheit von Calciumionen stattfindet.

In Abbildung 22e wurde Calcium nur während der Equilibrierungsperiode und der abgebildeten 44minütigen Sammelperiode weggelassen. Im Vergleich zu Abbildung 22d genügt es nicht, Calcium nur während der Superfusionsphase wegzulassen. Offensichtlich genügen geringe Ca^{++}-Konzentrationen für die spezifische Ausschüttung.

Abb. 22a-e: Einfluß ansteigender Ca^{++}-Konzentration auf die ^{14}C-Freisetzung

Markierung der Gewebeschnitte des Hypothalamus der Ratte mit 3×10^{-4} M ^{14}C-THN für 20 min. bei 37°C
⊢—⊣ Stimulation mit 31 mmol/l K^+ von der 8. - 13. und 28. - 33. min.

Abb. 22a zeigt die K^+-stimulierte ^{14}C-Ausschüttung in Anwesenheit von 2,54 mM Ca^{++}
o—o mit K^+-induzierter Depolarisation (n=6)
Δ—Δ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=2)

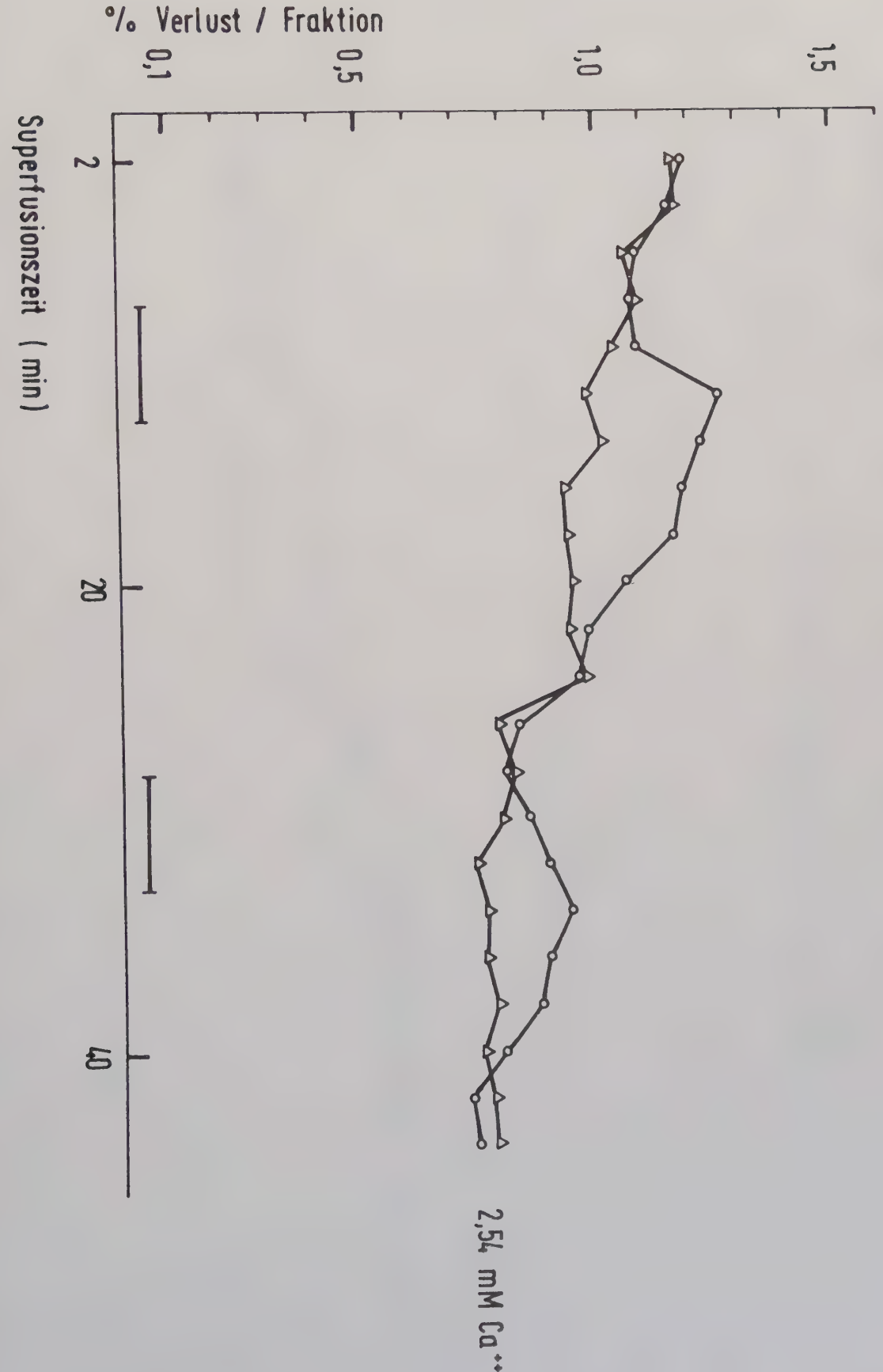
Abb. 22b zeigt die K^+-stimulierte ^{14}C-Ausschüttung in Anwesenheit von 1,27 mM Ca^{++}
o—o mit K^+-induzierter Depolarisation (n=9)
Δ—Δ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=3)

Abb. 22c zeigt die K^+-stimulierte ^{14}C-Ausschüttung in Abwesenheit von Ca^{++} während der Inkubation und anschließenden Superfusion
o—o mit K^+-induzierter Depolarisation (n=8)
Δ—Δ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=4)

Abb. 22d Zusammenstellung der Ergebnisse aus Abbildung 22a-c jeweils bezogen auf den spontanen ^{14}C-Ausstrom. Dabei ist während der Stimulationsphasen mit hohen K^+-Konzentrationen CGP 6085/A anwesend.

Abb. 22e zeigt die K^+-stimulierte ^{14}C-Ausschüttung in Abwesenheit von Ca^{++} nur während der Superfusionsperiode.
o—o mit K^+-induzierter Depolarisation (n=6)
Δ—Δ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=2)

Abb. 22a


% Verlust / Fraktion
0,1
0,5
1,0
1,5
2
20
40
Superfusionszeit (min)
2,54 mM Ca++

Bb. 22b

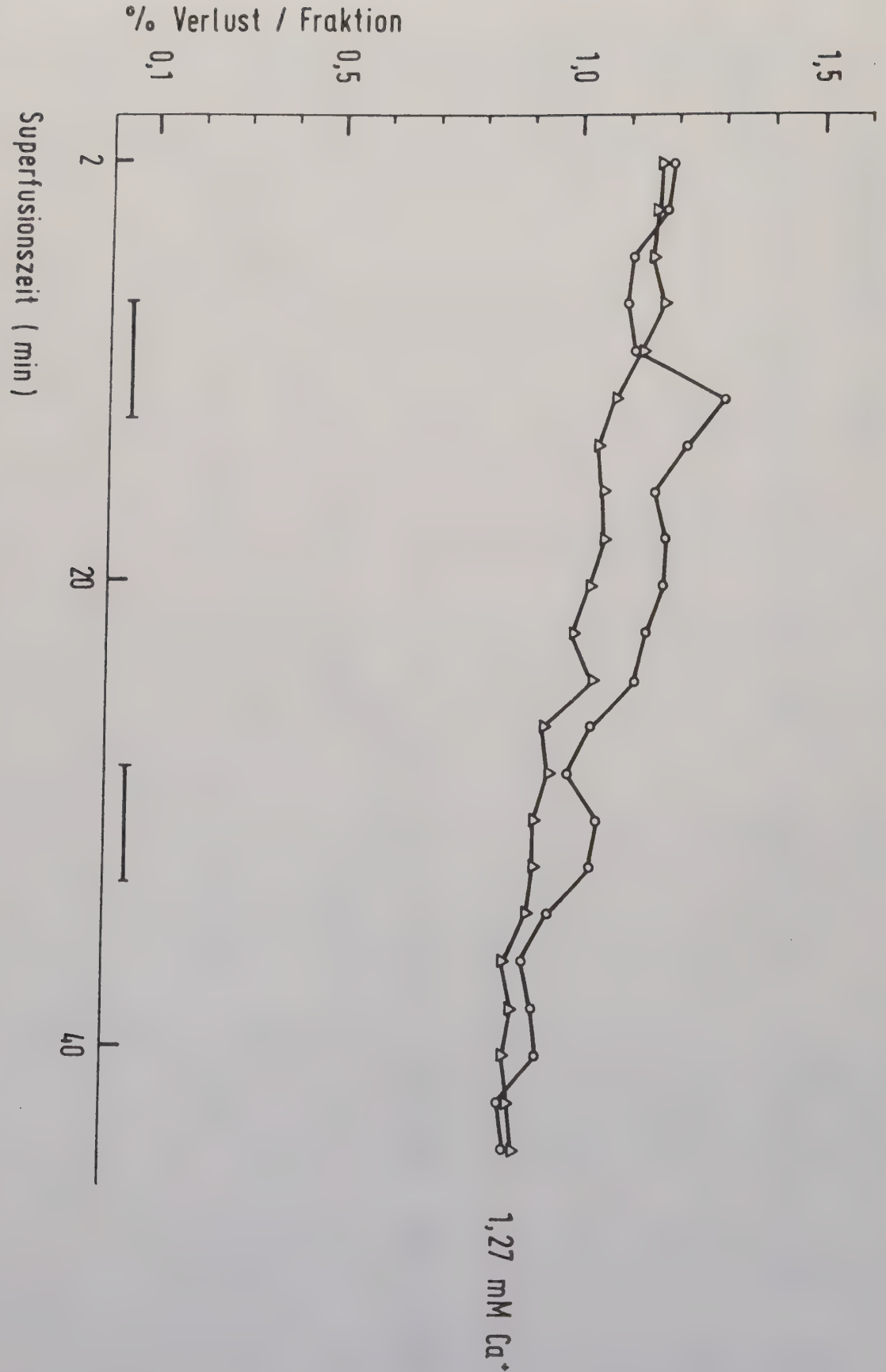
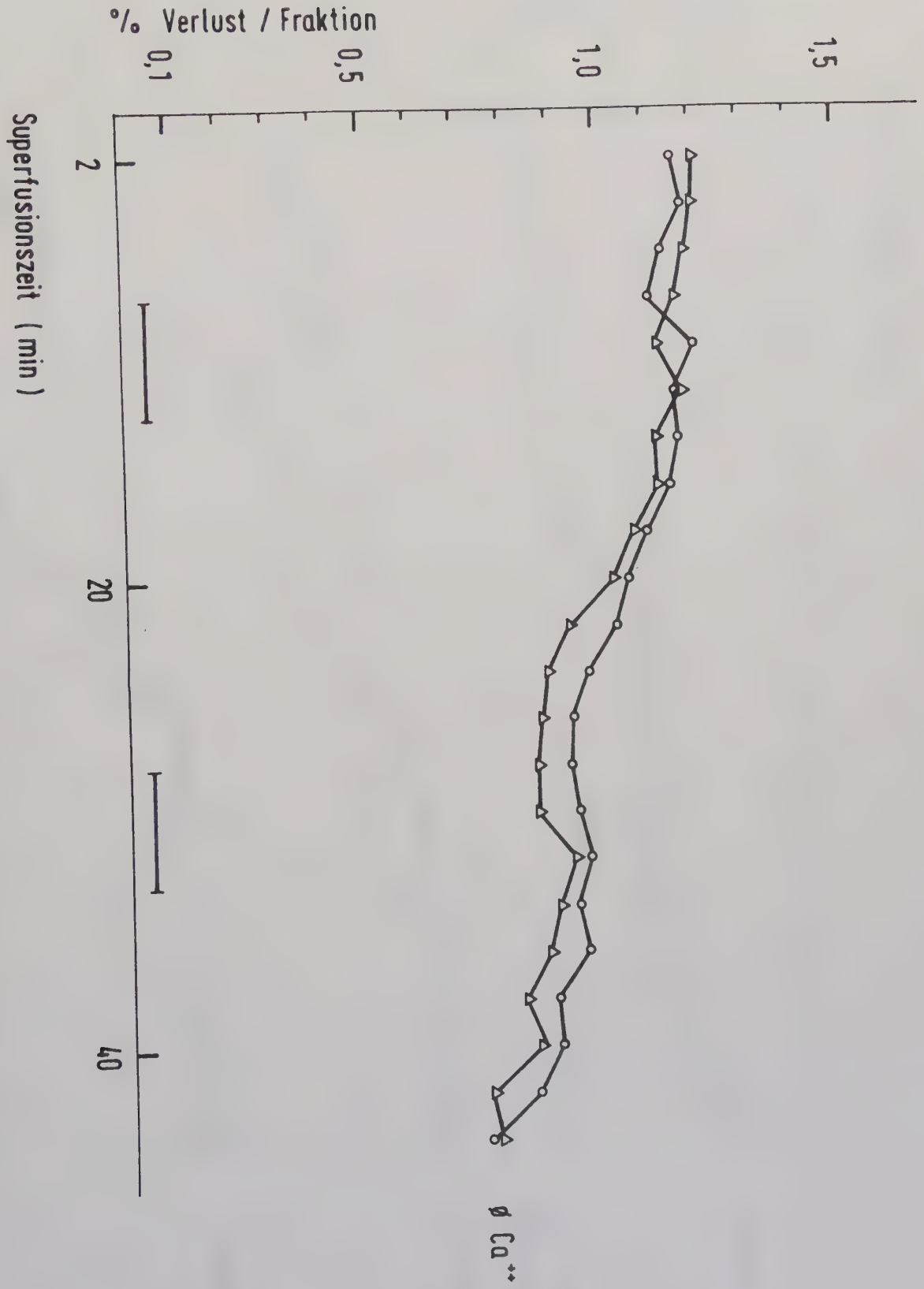

% Verlust / Fraktion
0,1
0,5
1,0
1,5
Superfusionszeit (min)
2
20
40
1,27 mM Ca++

Abb. 22c


% Verlust / Fraktion
0,1
0,5
1,0
1,5
Superfusionszeit (min)
2
20
40
ø Ca++

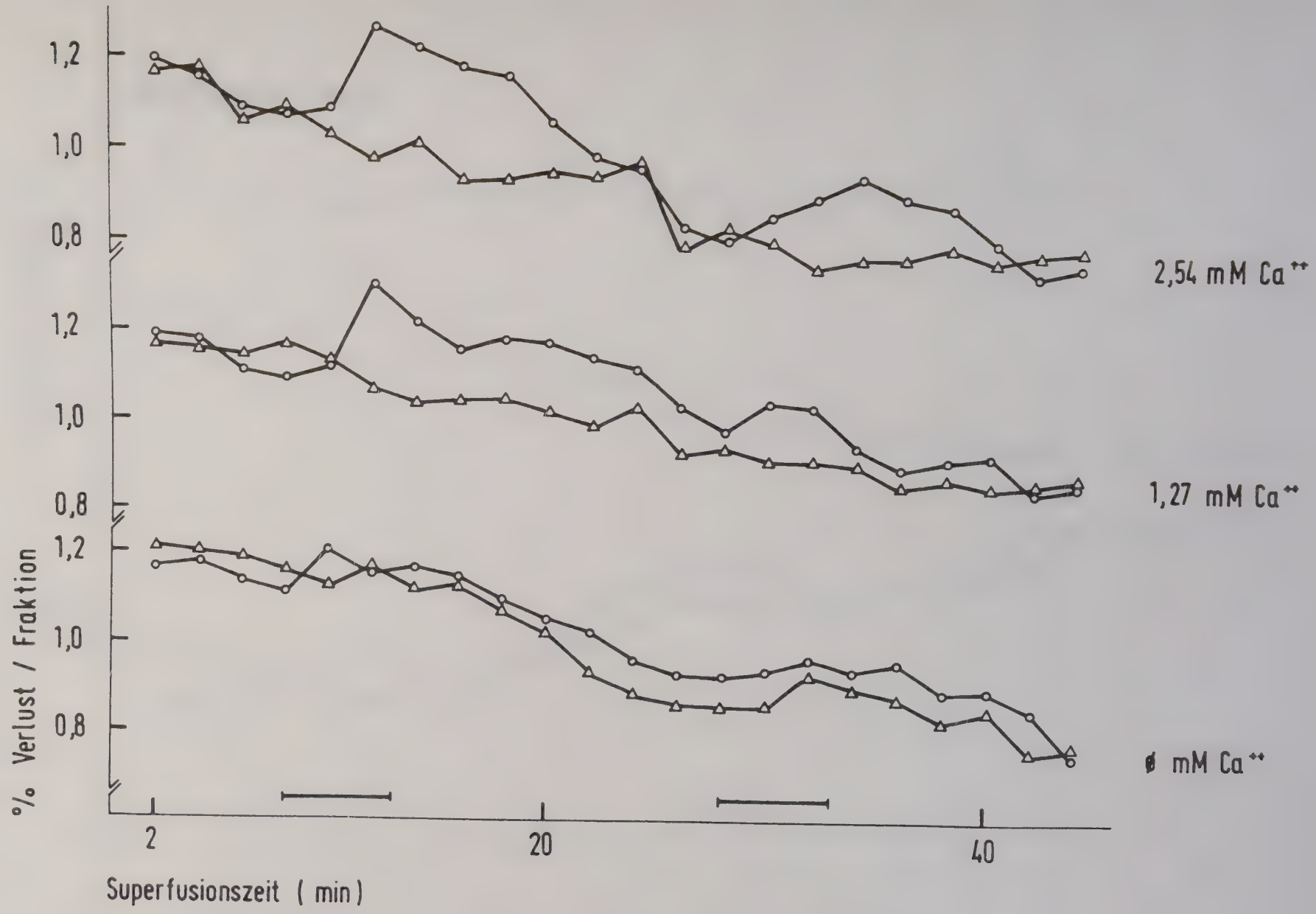
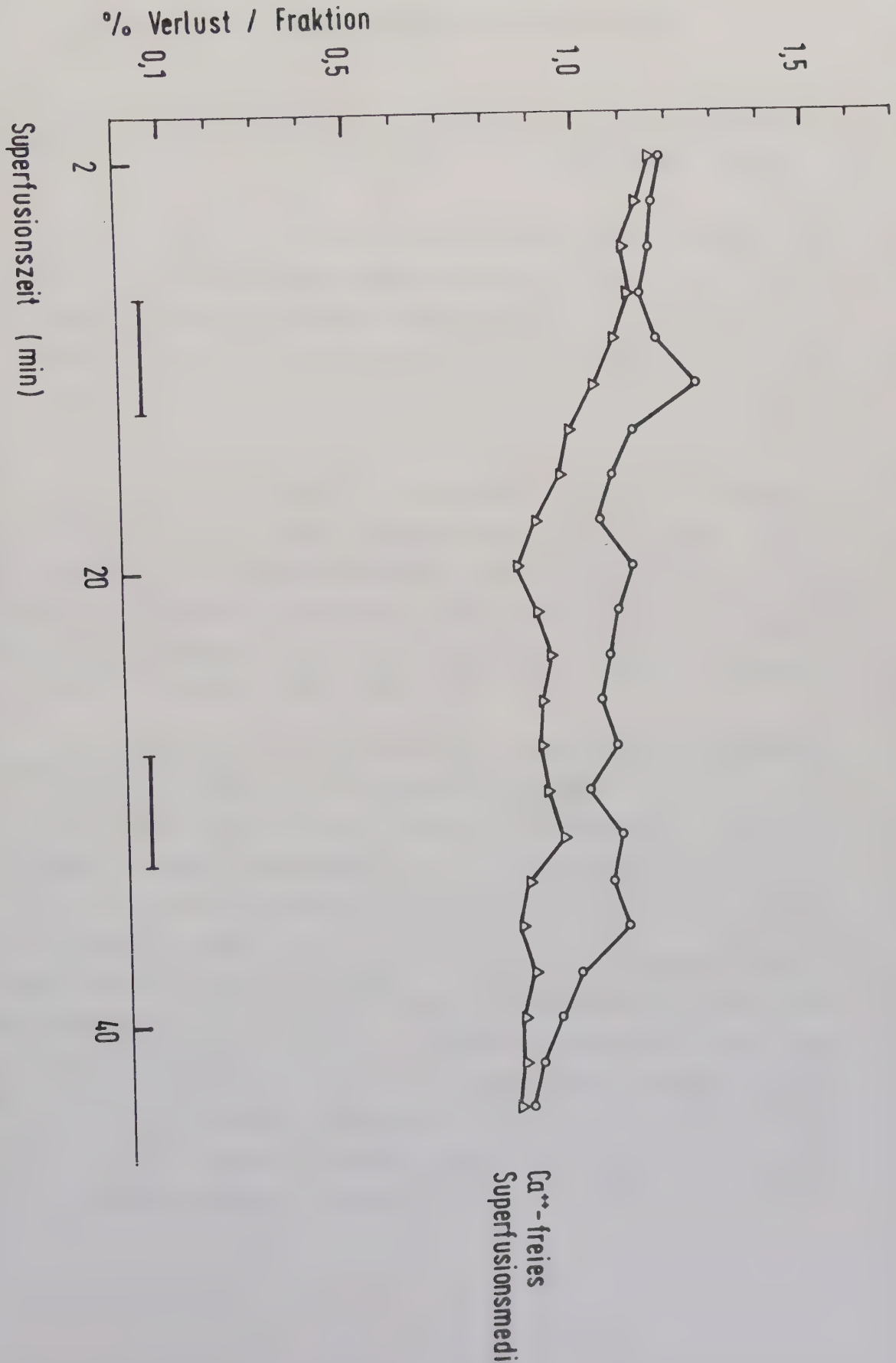

1,2
1,0
0,8
1,2
1,0
0,8
1,2
1,0
0,8
% Verlust / Fraktion
2,54 mM Ca++
1,27 mM Ca++
0 mM Ca++
2
20
40
Superfusionszeit (min)

Abb. 22d

Abb. 22e


% Verlust / Fraktion
0,1
0,5
1,0
1,5
Superfusionszeit (min)
2
20
40
Ca++-freies
Superfusionsmedium

D II 3. ^{14}C-Freisetzung nach Reserpin-Vorbehandlung

Schließlich stellte sich die Frage, ob THN spezifisch in die Vesikel aufgenommen und aus diesen auch spezifisch ausgeschüttet wird.

Die spezifische Transmitterausschüttung durch Exocytose stellt man sich als aktiven energieverbrauchenden Prozeß vor, bei dem die synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran in Kontakt treten und ihren Inhalt in den synaptischen Spalt freisetzen (FRIED & BLAUSTEIN, 1976; RAITERI et al., 1975).

Reserpin blockiert die Monoamin-Aufnahme in die synaptischen Vesikel. Mit der Reserpin-Vorbehandlung wurde untersucht, ob THN aus diesem Zellkompartiment spezifisch ausgeschüttet wird. Die Vorbehandlung der Ratten mit Reserpin wurde entsprechend durchgeführt,wie es bereits vor der Inkubation mit ^{3}H-5-HT beschrieben wurde (siehe Seite 45).

Anschließend wurden die Gewebeschnitte des Hypothalamus mit 3×10^{-4} M ^{14}C-THN für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Während der Sammelperiode wurde durch Erhöhung der K^+-Konzentration(in Gegenwart von CGP 6085/A)von 6 auf 31 mmol/l 2mali eine Depolarisation ausgelöst von der 8. bis zur 13. und von der 28. bis zur 33. Minute. In Abbildung 23 zeigt das untere Kurvenpaar, daß nach Reserpin-Vorbehandlung keine deutliche K^+-induzierte Ausschüttung ausgelöst werden kann. Das obere Kurvenpaar wurde mit Hypothalamusschnitten von unbehandelten Tieren erzielt. Die Kurven sind jeweils bezogen auf den spontanen ^{14}C-Ausstrom, der ohne Stimulation mit hohen K^+-Konzentrationen erzielt wurde. Dabei hat die alleinige Anwesenheit von CGP 6085/A keinen Einfluß auf die

^{14}C-Freisetzung. Der spontane ^{14}C-Ausstrom wird durch die Reserpin-Vorbehandlung nicht beeinflußt.

Abb. 23: Einfluß der Reserpin-Vorbehandlung der Ratten auf die ^{14}C-Freisetzung

Markierung der Gewebeschnitte des Hypothalamus der Ratte mit 3 x 10^{-4} M ^{14}C-THN für 20 min. bei 37°C

⟷ Stimulation mit 31 mmol/l K^+ von der 8. - 13 und 28. - 33. min.

Das obere Kurvenpaar zeigt die K^+-stimulierte ^{14}C-Ausschüttung ohne vorausgegangene Reserpin-Behandlung

○—○ mit K^+-induzierter Depolarisation (n=6)

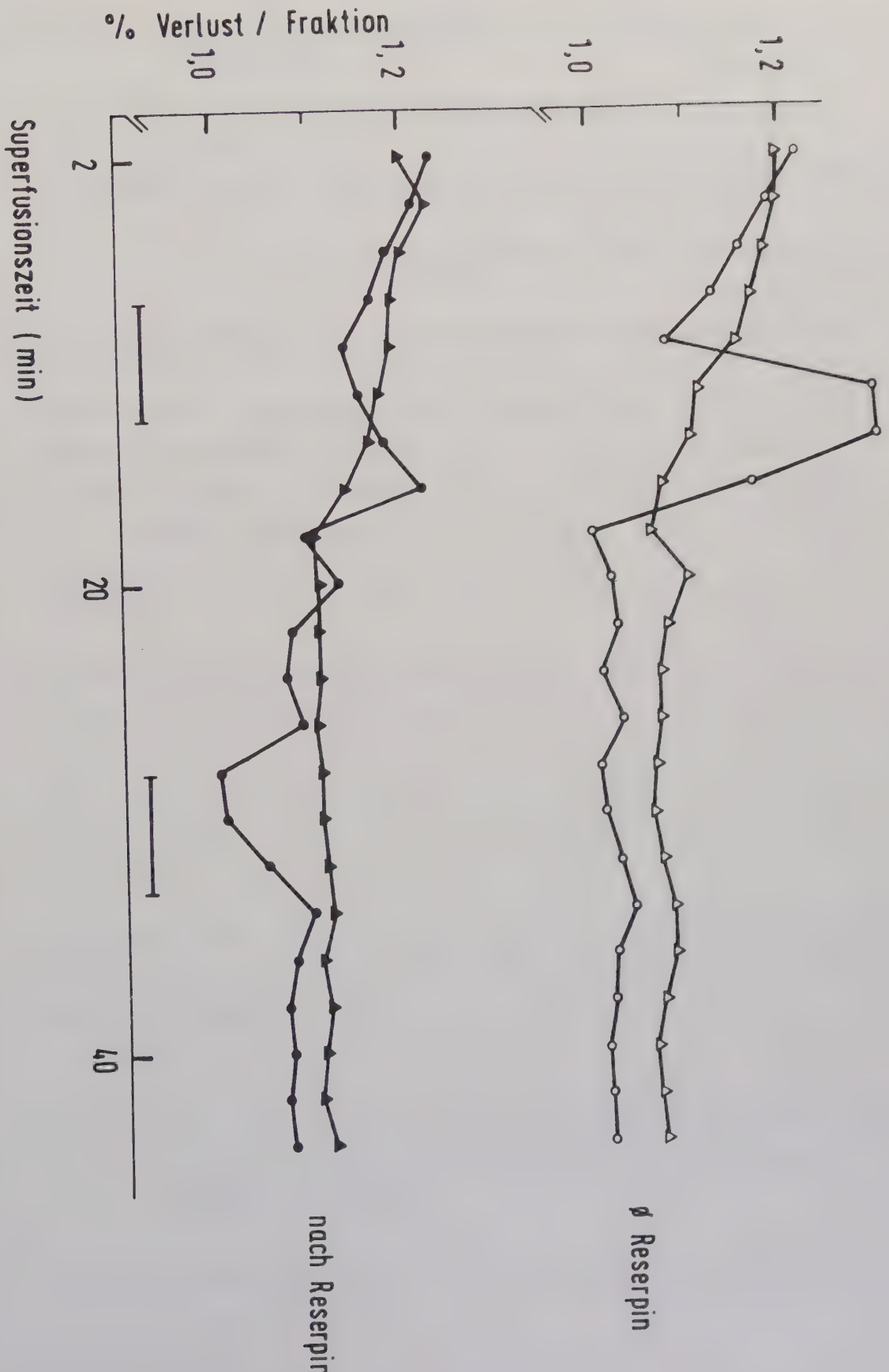
△—△ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=2)

Das untere Kurvenpaar zeigt die K^+-stimulierte ^{14}C-Ausschüttung nach vorausgegangener Reserpin-Behandlung der Ratte

●—● mit K^+-induzierter Depolarisation (n=8)

▲—▲ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=4)

Abb. 23


% Verlust / Fraktion
1,0
1,2
1,0
1,2
2
20
40
Superfusionszeit (min)
ø Reserpin
nach Reserpin

Die hier vorgelegten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:
die mit der ^{14}C-Freisetzung gemessene THN-Ausschüttung ist

1) durch K^+-induzierte Depolarisation stimulierbar,

2) abhängig von der Ca^{++}-Konzentration und

3) nach Reserpin-Vorbehandlung nicht mehr nachweisbar.

Diese Ergebnisse bestärken die Vermutung, daß die THN-Ausschüttung aus synaptischen Vesikeln durch einen exocytotischen Prozeß erfolgt. Damit ist ein weiterer Hinweis erbracht, der für THN als mutmaßlichen Transmitter spricht.

D III. SPEZIFISCHE AUSSCHÜTTUNG VON THN UND 5-HT GLEICHZEITIG

Mit den vorausgegangenen Experimenten konnte der Nachweis erbracht werden, daß die synaptischen Vesikel das Zellkompartiment sind, aus dem THN spezifisch ausgeschüttet wird. Nun stellte sich die Frage, ob beide radioaktiv markierten Substanzen in die Vesikel aufgenommen werden und welchen Effekt diese Doppelmarkierung auf die anschließende spezifische Ausschüttung hat. Anhand dieser Experimente sollte überprüft werden, ob THN Eigenschaften eines 'Cotransmitters' hat. Das heißt, die Substanz koexistiert in geringerer Konzentration in dem gleichen Vesikel mit dem Transmitter, wird über die gleichen Mechanismen ausgeschüttet und zeigt schwächere postsynaptische Effekte als der Transmitter (CHAN-PALAY et al., 1978; BORYS et al., 1973; BROWNSTEIN et al., 1974).

Als weitere Möglichkeit wurde auch untersucht, ob THN als 'falscher Transmitter' wirkt. Das heißt, exogene Zufuhr dieser Substanz führt zur Verdrängung des Transmitters, so daß eine anschließende Stimulation des Neurons zur Ausschüttung dieser Substanz anstelle des Transmitters führen würde (FISCHER et al., 1965; MUSACCHIO et al., 1966).

Die Ergebnisse unserer Doppelmarkierungs-Experimente liefern Hinweise dafür, inwieweit die THN-Wirkung einem dieser Konzepte entspricht.

D III 1. ^{3}H- und ^{14}C-Freisetzung nach Inkubation mit ansteigenden ^{3}H-5HT-Konzentrationen bei konstanter ^{14}C-THN-Konzentration

Zunächst wurde, wie bereits beschrieben, die Gewebepräpara-

tion aus dem Hypothalamus der Ratte hergestellt. Bei der anschließenden Inkubation wurden variierte Konzentrationen von ^{3}H-5-HT dem Inkubationsmedium zugegeben zusammen mit einem konstanten Betrag an ^{14}C-THN. Während der Superfusion wurde mit hoher K^+-Konzentration in Gegenwart von CGP 6085/A wiederholt stimuliert und zwar von der 8. bis zur 13. und von der 28. bis zur 33. Minute. Abbildung 24 a-d zeigt anhand der freigesetzten Radioaktivität die gegenseitige Beeinflussung beider Substanzen. Die K^+-stimulierte ^{3}H- und ^{14}C-Freisetzung wurde nach Inkubation mit jeweils 1,5 x 10^{-4} M ^{14}C-THN und variierten ^{3}H-5HT-Konzentrationen erzielt.

In Abbildung 24a führt die Inkubation mit 0,63 x 10^{-7} M ^{3}H-5-HT und 1,5 x 10^{-4} M ^{14}C-THN während der anschließenden K^+-Stimulation zu einer deutlichen Freisetzung beider Substanzen auch während der wiederholten Stimulation. Die gleiche ^{14}C-THN-Konzentration bei 1,25 x 10^{-7} M ^{3}H-5-HT zeigt einen deutlicheren Effekt bei der K^+-Stimulation (Abb. 24b). Identische ^{14}C-THN-Konzentration führt bei einem weiteren Anstieg der ^{3}H-5HT-Konzentration auf 2,5 x 10^{-7} M zu einer gesteigerten Freisetzung beider Substanzen (Abb. 24c). Mit der höchsten ^{3}H-5HT-Konzentration von 5 x 10^{-7} M ist der Effekt auf die Freisetzung beider Substanzen auch am größten (Abb. 24d). Die K^+-Stimulation wurde jeweils in Gegenwart von CGP 6085/A durchgeführt.

In allen Abbildungen sind die Kurven bezogen auf den zugehörigen spontanen Ausstrom an Radioaktivität dargestellt, der in Anwesenheit von CGP 6085/A ohne K^+-Stimulation gemessen wurde. CGP 6085/A hat weder einen Einfluß auf die ^{3}H- noch auf die ^{14}C-Freisetzung. Die Doppelmarkierung hat auf den spontanen Ausstrom beider Substanzen ebenfalls keinen Effekt.

Tabelle 4 faßt die Werte zusammen, die mit Hilfe der Planimetrie aus Abbildung 24 a-d gewonnen wurden. Die Flächen der ersten und zweiten Stimulationsphase (S_1, S_2) bezogen auf den jeweiligen spontanen Ausstrom wurden für die K^+-induzierte ^3H- und ^{14}C-Ausschüttung planimetriert. Das Ergebnis ist in Abbildung 25 dargestellt. Die Säulen repräsentieren jeweils die ^3H- und ^{14}C-Freisetzung (▨,▧). Sie verdeutlichen, daß ansteigende 5-HT-Konzentrationen bei fixer THN-Konzentration zu einer erhöhten Freisetzung beider Substanzen führen. Dabei hängt die ^3H-Freisetzung während beider Stimulationsperioden von der ^3H-Konzentration im Inkubationsansatz ab. Interessant ist, daß die Freisetzung der ^{14}C-markierten Substanz ebenfalls ansteigt, obwohl die ^{14}C-THN-Konzentration in allen Inkubationsansätzen identisch war. Außerdem wird durch die K^+-Stimulation ^3H-5-HT und ^{14}C-THN nach Doppelmarkierung stärker ausgeschüttet als nach Inkubation mit der jeweiligen Substanz allein bei gleicher Konzentration (vergleiche Abb. 20b: Inkubation mit $1{,}5 \times 10^{-4}$ M ^{14}C-THN allein und Abb. 14: Inkubation mit $2{,}5 \times 10^{-7}$ M ^3H-5-HT allein).

Abb. 24 a-d: Einfluß ansteigender 5-HT-Konzentration bei konstanter THN-Konzentration auf die ^{3}H- und ^{14}C-Freisetzung

Doppelmarkierung der Gewebeschnitte des Hypothalamus der Ratte mit ^{3}H-5-HT für 15 min. und ^{14}C-THN für 20 min. bei 37°C

⊢—⊣ Stimulation mit 31 mmol/l K^{+} von der 8. - 13. und 28. - 33. min.

Abb. 24a: Das obere Kurvenpaar zeigt die ^{3}H-Freisetzung nach gleichzeitiger Inkubation mit 0,63 x 10^{-7} M ^{3}H-5-HT und 1,5 x 10^{-4} M ^{14}C-THN

o—o mit K^{+}-induzierter Depolarisation (n=8)

Δ—Δ ohne K^{+}-induzierte Depolarisation (n=4)

Das untere Kurvenpaar zeigt die ^{14}C-Freisetzung unter denselben Bedingungen

●—● mit K^{+}-induzierter Depolarisation (n=8)

▲—▲ ohne K^{+}-induzierte Depolarisation (n=4)

Abb. 24b: Das obere Kurvenpaar zeigt die ^{3}H-Freisetzung nach gleichzeitiger Inkubation mit 1,25 x 10^{-7}M ^{3}H-5-HT und 1,5 x 10^{-4}M ^{14}C-THN

o—o mit K^{+}-induzierter Depolarisation (n=9)

Δ—Δ ohne K^{+}-induzierte Depolarisation (n=3)

Das untere Kurvenpaar zeigt die ^{14}C-Freisetzung unter denselben Bedingungen

●—● mit K^{+}-induzierter Depolarisation (n=9)

▲—▲ ohne K^{+}-induzierte Depolarisation (n=3)

Abb. 24c: Das obere Kurvenpaar zeigt die ^{3}H-Freisetzung nach gleichzeitiger Inkubation mit 2,5 x 10^{-7}M ^{3}H-5-HT und 1,5 x 10^{-4}M ^{14}C-THN

o—o mit K^{+}-induzierter Depolarisation (n=8)

Δ—Δ ohne K^{+}-induzierte Depolarisation (n=4)

Das untere Kurvenpaar zeigt die ^{14}C-Freisetzung unter denselben Bedingungen

●—● mit K^+-induzierter Depolarisation (n=8)

▲—▲ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=4)

Abb. 24d: Das obere Kurvenpaar zeigt die ^{3}H-Freisetzung nach gleichzeitiger Inkubation mit 5×10^{-7}M ^{3}H-5-HT und $1{,}5 \times 10^{-4}$M ^{14}C-THN

○—○ mit K^+-induzierter Depolarisation (n=4)

△—△ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=4)

Das untere Kurvenpaar zeigt die ^{14}C-Freisetzung unter denselben Bedingungen

●—● mit K^+-induzierter Depolarisation (n=4)

▲—▲ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=4)

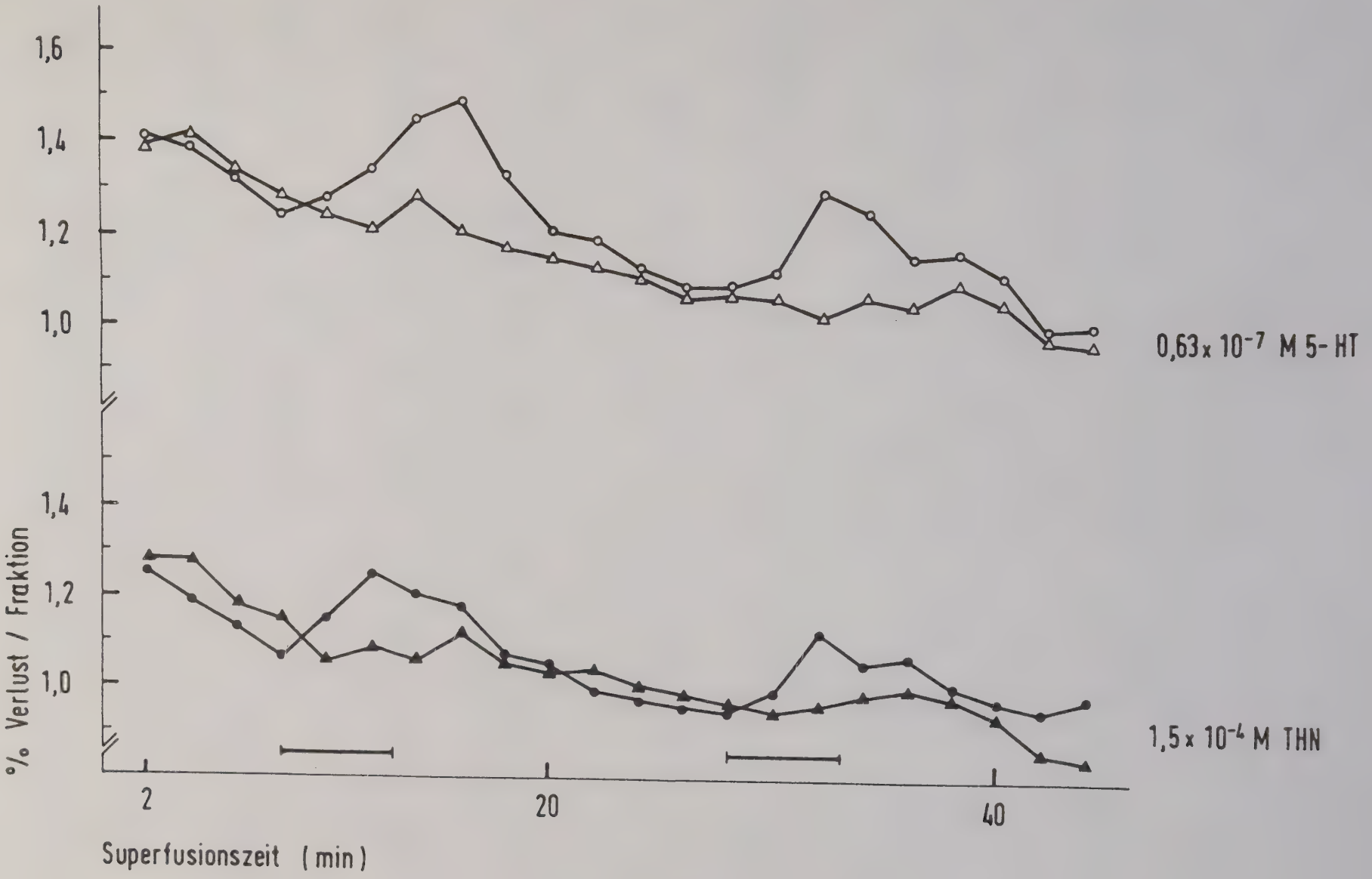
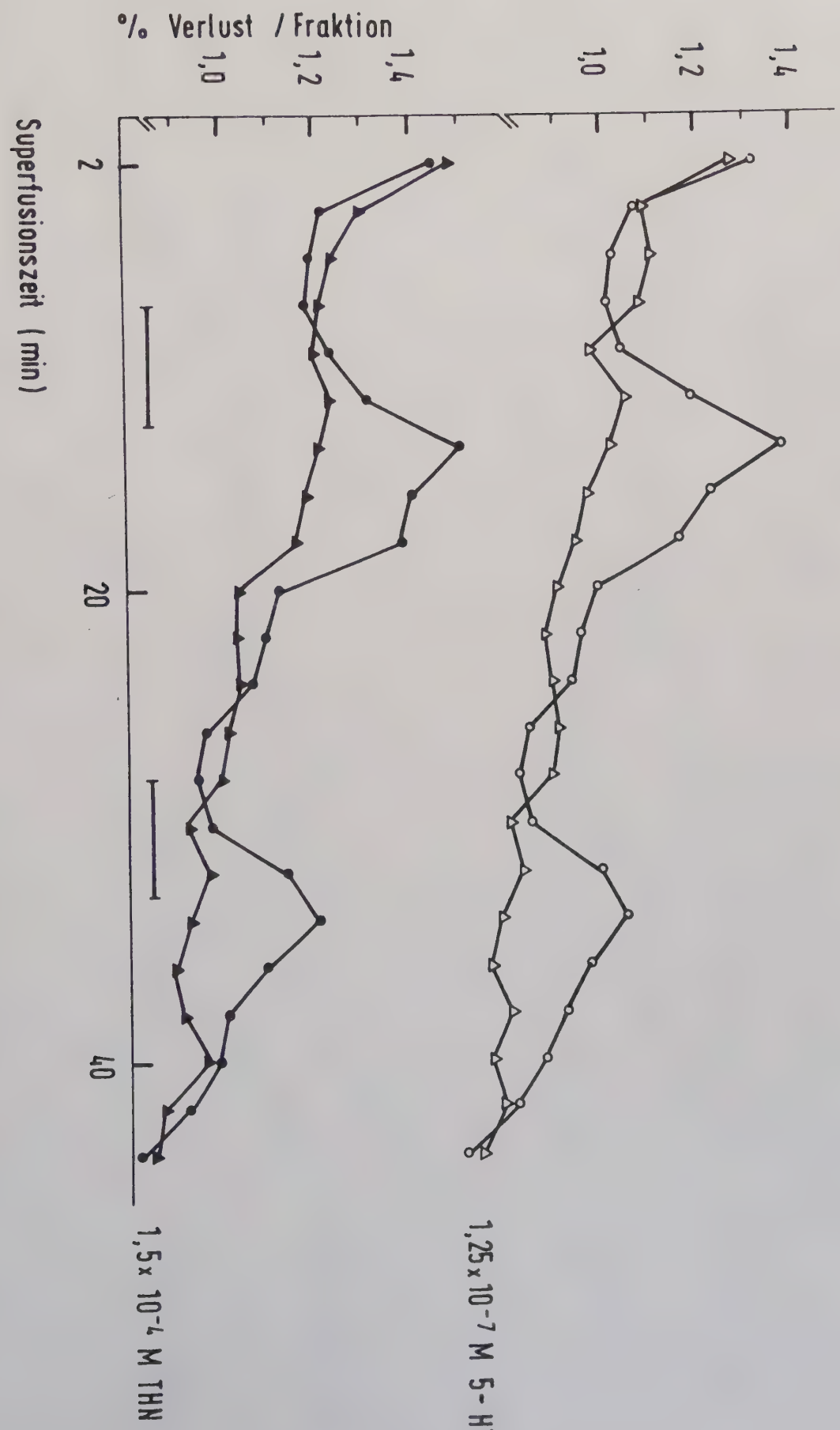

1,6
1,4
1,2
1,0
0,63 x 10⁻⁷ M 5-HT
1,4
1,2
1,0
1,5 x 10⁻⁴ M THN
% Verlust / Fraktion
2
20
40
Superfusionszeit (min)

Abb. 24a

Abb. 24b


% Verlust / Fraktion
1,0
1,2
1,4
2
20
40
Superfusionszeit (min)
1,25 x 10⁻⁷ M 5-HT
1,5 x 10⁻⁴ M THN

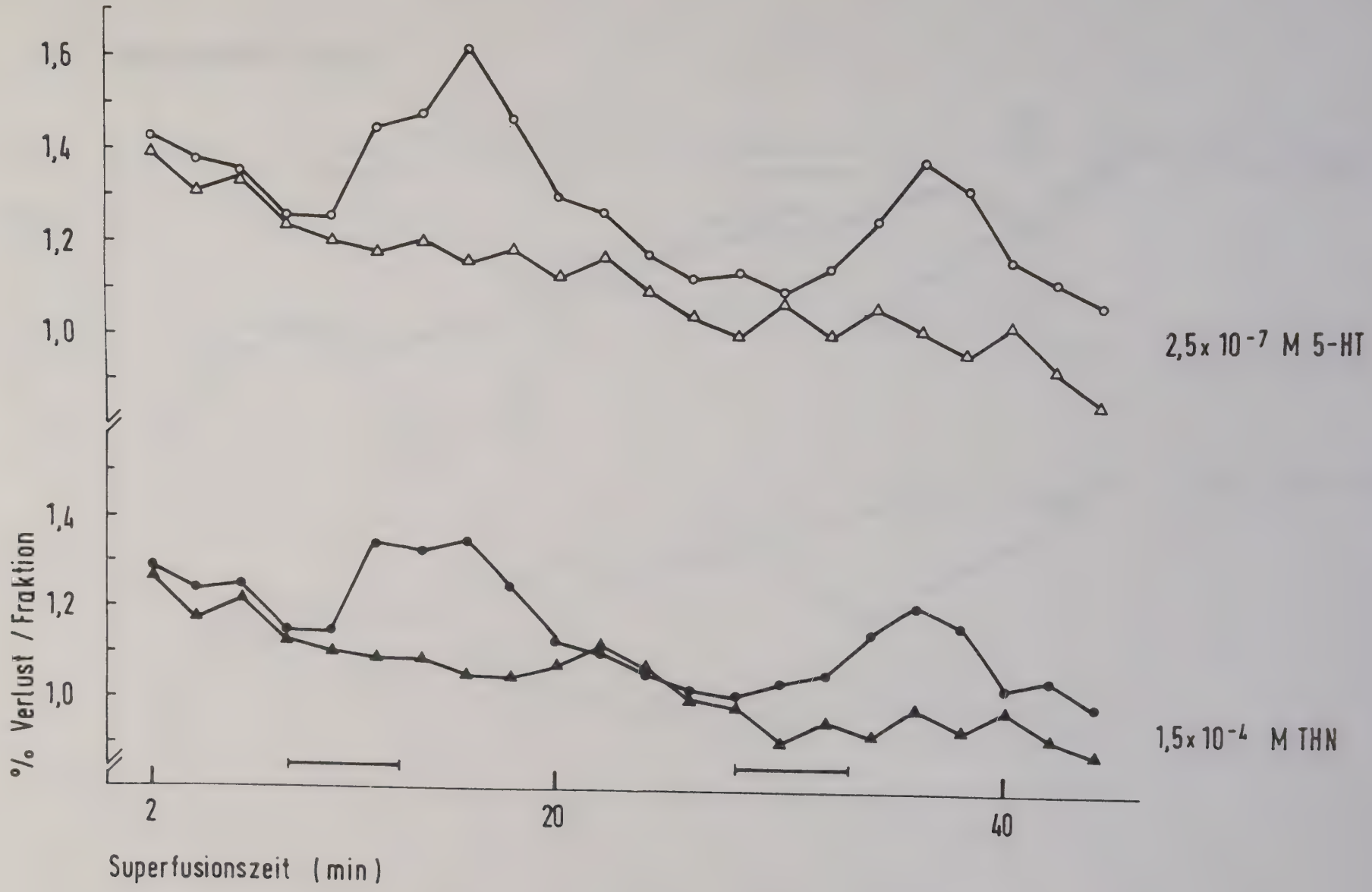
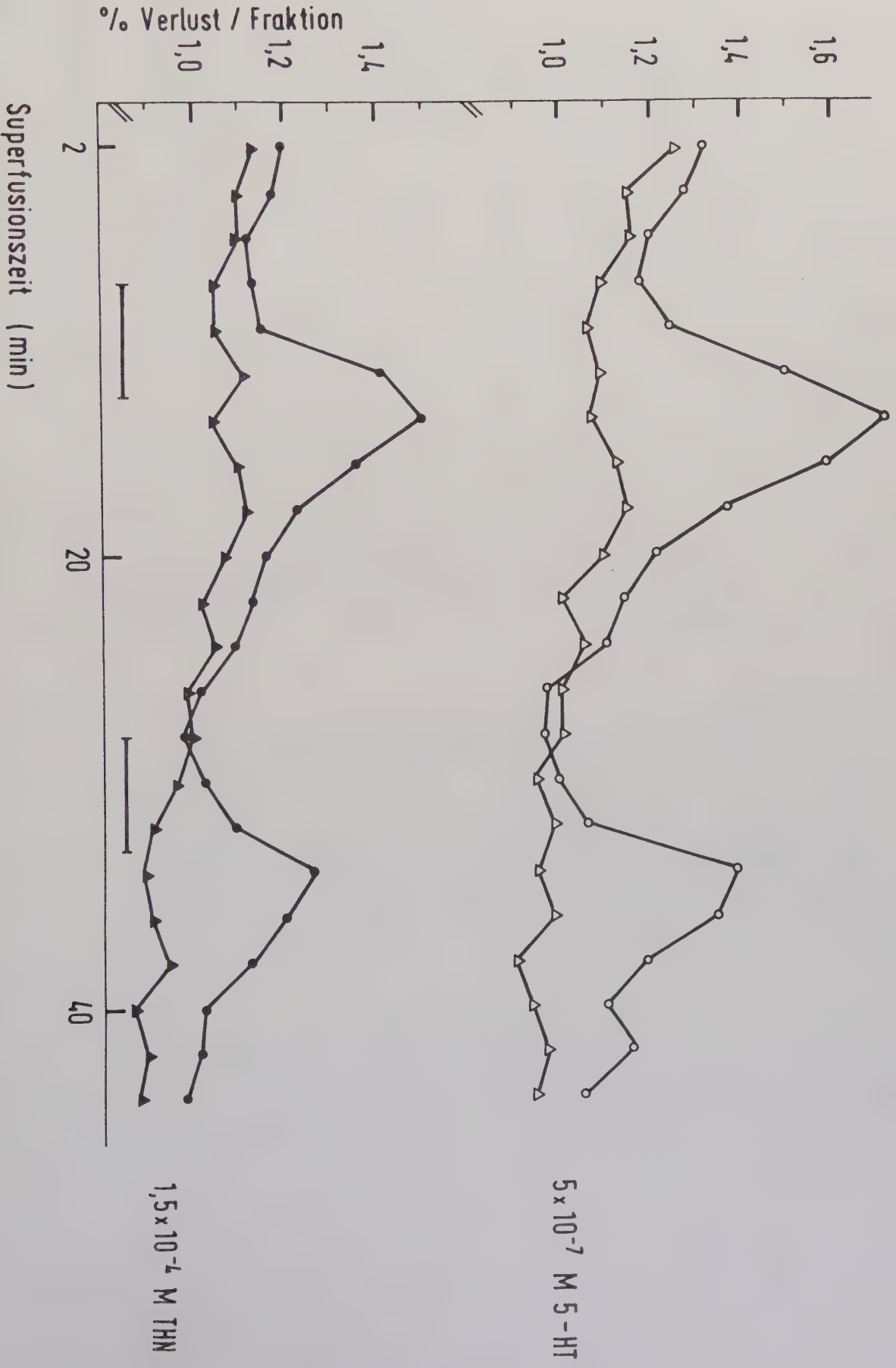

1,6
1,4
1,2
1,0
2,5x 10⁻⁷ M 5-HT
1,4
1,2
1,0
% Verlust / Fraktion
1,5x 10⁻⁴ M THN
2
20
40
Superfusionszeit (min)

Abb. 24c

Abb. 24d


% Verlust / Fraktion
1,0
1,2
1,4
1,6
2
20
40
Superfusionszeit (min)
5 x 10⁻⁷ M 5-HT
1,5 x 10⁻⁴ M THN

	S_1		S_2	
	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C
I	Ø	68	Ø	46
II	81	46	65	39
III	109	86	86	69
IV	138	115	103	96
V	209	127	120	118

Tab. 4: Werte der planimetrierten Flächen während der ersten und zweiten Stimulationsphase (S_1, S_2) mit 31 mmol/l K^+, jeweils bezogen auf den spontanen Ausstrom der Radioaktivität. ^3H- und ^{14}C-Freisetzung nach Doppelmarkierung mit ansteigender ^3H-5HT- und konstanter ^{14}C-THN-Konzentration.

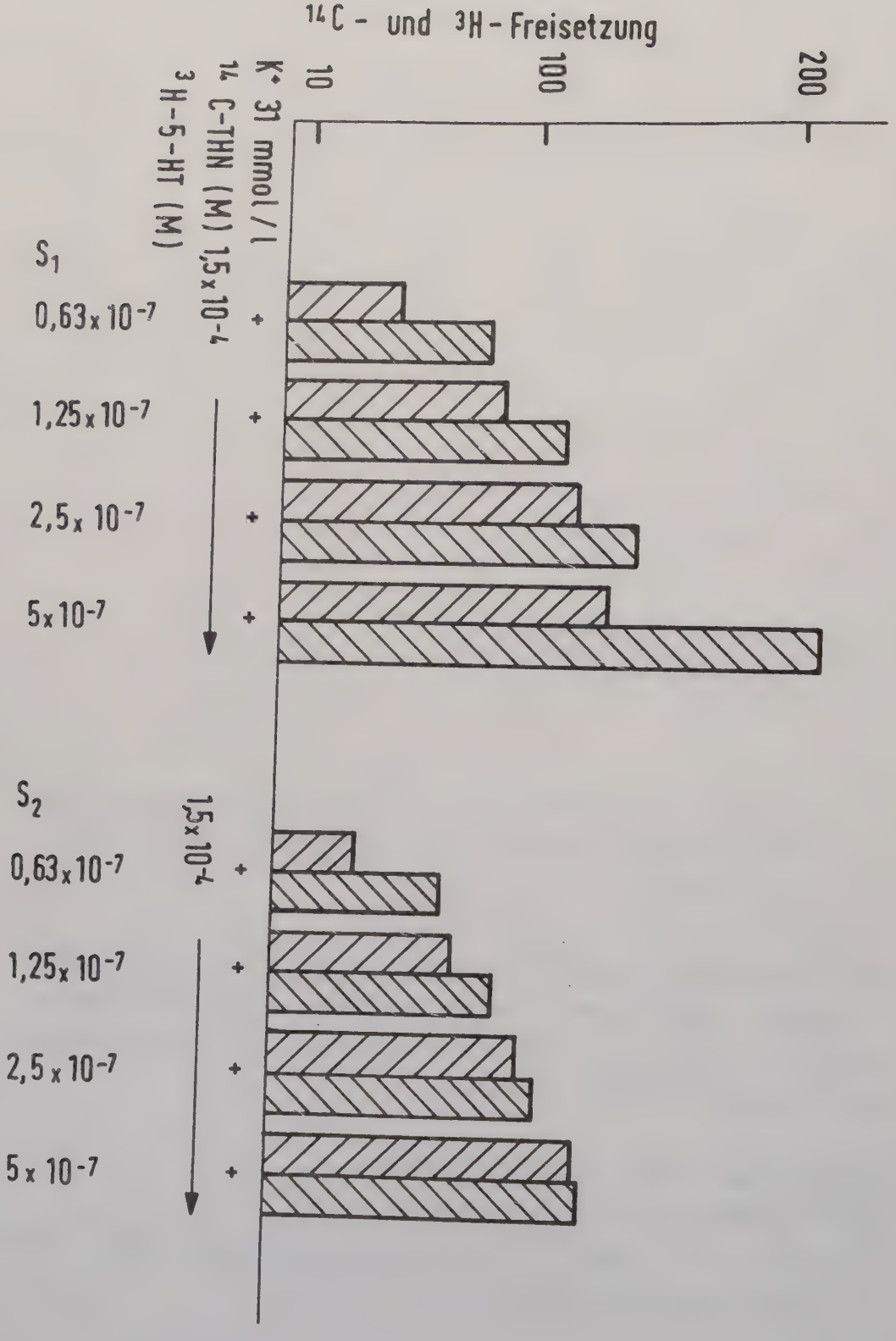
I : 1,5 x 10^{-4} M ^{14}C-THN ohne ^3H-5-HT
II : 1,5 x 10^{-4} M ^{14}C-THN + 0,63 x 10^{-7} M ^3H-5-HT
III: 1,5 x 10^{-4} M ^{14}C-THN + 1,25 x 10^{-7} M ^3H-5-HT
IV : 1,5 x 10^{-4} M ^{14}C-THN + 2,5 x 10^{-7} M ^3H-5-HT
V : 1,5 x 10^{-4} M ^{14}C-THN + 5 x 10^{-7} M ^3H-5-HT

Abb. 25: ^{3}H- und ^{14}C-Freisetzung nach Doppelmarkierung mit ansteigender ^{3}H-5HT- und konstanter ^{14}C-THN-Konzentration

Graphische Darstellung der Werte der planimetrierten Flächen während der K^{+}-induzierten ^{3}H- und ^{14}C-Freisetzung bezogen auf den jeweiligen spontanen Ausstrom der Radioaktivität

▨ K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung
▧ K^{+}-induzierte ^{14}C-Ausschüttung
S_1 und S_2: ^{3}H- und ^{14}C-Ausschüttung während der 1. und 2. Stimulationsphase mit 31 mmol/l K^{+}

Abb. 25


14C - und 3H - Freisetzung
10
100
200
K+ 31 mmol/l
14C-THN (M) 15x10-4
3H-5-HT (M)
S1
0,63x10-7
1,25x10-7
2,5x10-7
5x10-7
S2
15x10-4
0,63x10-7
1,25x10-7
2,5x10-7
5x10-7

D.III.2. ^{3}H- und ^{14}C-Freisetzung nach Inkubation mit ansteigenden ^{14}C-THN-Konzentrationen bei konstanter ^{3}H-5HT-Konzentration

In diesen Experimenten wurde die Versuchsanordnung umgekehrt. Die Inkubation wurde mit konstanten ^{3}H-5HT-Konzentrationen bei ansteigender ^{14}C-THN-Konzentration im Inkubationsmedium durchgeführt. Die anschließende ^{14}C-Freisetzung in das Superfusionsmedium stieg Dosis-abhängig an. Bemerkenswert ist, daß die Freisetzung der ^{3}H-5HT-markierten Substanz ebenfalls anstieg.

Abbildung 26 a-c zeigt die K^{+}-stimulierten ^{3}H- und ^{14}C-Freisetzung nach Inkubation mit 2,5 x 10^{-7}M ^{3}H-5HT. Die ^{14}C-THN-Konzentration variiert von 8 x 10^{-5}, 1,5 x 10^{-4} bis 3 x 10^{-4} M ^{14}C-THN. Dabei zeigt sich in Abbildung 26a nach Inkubation mit 8 x 10^{-5}M ^{14}C-THN in Anwesenheit von ^{3}H-5-HT bei der anschließenden K^{+}-induzierten Ausschüttung ein deutlicherer Effekt als nach der Inkubation mit THN allein (vergleiche Abb. 20a). Dieser Effekt zeigt sich auch für die höheren Konzentrationen von 1,5 x 10^{-4}M (Abb. 26b) und 3 x 10^{-4}M ^{14}C-THN (Abb. 26c). In allen Experimenten steigt die ^{3}H-5HT-Ausschüttung ebenfalls an, obwohl die Konzentration im Inkubationsansatz immer die gleiche war. Die Kurven sind wieder bezogen auf den spontanen ^{14}C- und ^{3}H-Ausstrom, der unter entsprechenden Bedingungen gemessen wurde, nur in Anwesenheit von CGP 6085/A während der wiederholten Stimulationsphasen. Der spontane Ausstrom der Radioaktivität wird durch die Doppelmarkierung nicht beeinflußt. Auch mit der zweiten Stimulationsphase wird nach der Doppelmarkierung ein jeweils deutlicherer Effekt auf die ^{14}C- und ^{3}H-Ausschüttung erzielt. Dieser Effekt hängt möglicherweise damit zusammen, daß die Vesikel normalerweise nicht vollständig mit 5-HT aufgefüllt sind.

Darauf könnte ihre Kapazität beruhen, THN auch in ansteigenden Konzentrationen aufzunehmen.

In Abbildung 27 entsprechen die dargestellten Säulen dem Wert der planimetrierten Fläche (siehe Tab. 5) während der ersten und zweiten Stimulationsphase (S_1, S_2) jeweils für die ^{14}C- und ^{3}H-Ausschüttung (▨, ▨). Dabei ist deutlich festzustellen, daß ansteigende THN-Konzentrationen sowohl die ^{14}C- als auch die ^{3}H-Freisetzung Dosis-abhängig erhöhen.

Abb. 26 a-c: Einfluß ansteigender THN-Konzentration bei konstanter 5-HT-Konzentration auf die ^{3}H- und ^{14}C-Freisetzung

Doppelmarkierung der Gewebeschnitte des Hypothalamus der Ratte mit ^{14}C-THN für 20 min. und ^{3}H-5-HT für 15 min. bei 37°C.
⊢——⊣ Stimulation mit 31 mmol/l K^+ von der 8. - 13. und 28. - 33. min.

Abb. 26a: Das obere Kurvenpaar zeigt die ^{14}C-Freisetzung nach gleichzeitiger Inkubation mit 8 x 10^{-5}M ^{14}C-THN und 2,5 x 10^{-7}M ^{3}H-5-HT
○—○ mit K^+-induzierter Depolarisation (n=8)
△—△ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=3)
Das untere Kurvenpaar zeigt die ^{3}H-Freisetzung unter denselben Bedingungen
●—● mit K^+-induzierter Depolarisation (n=8)
▲—▲ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=3)

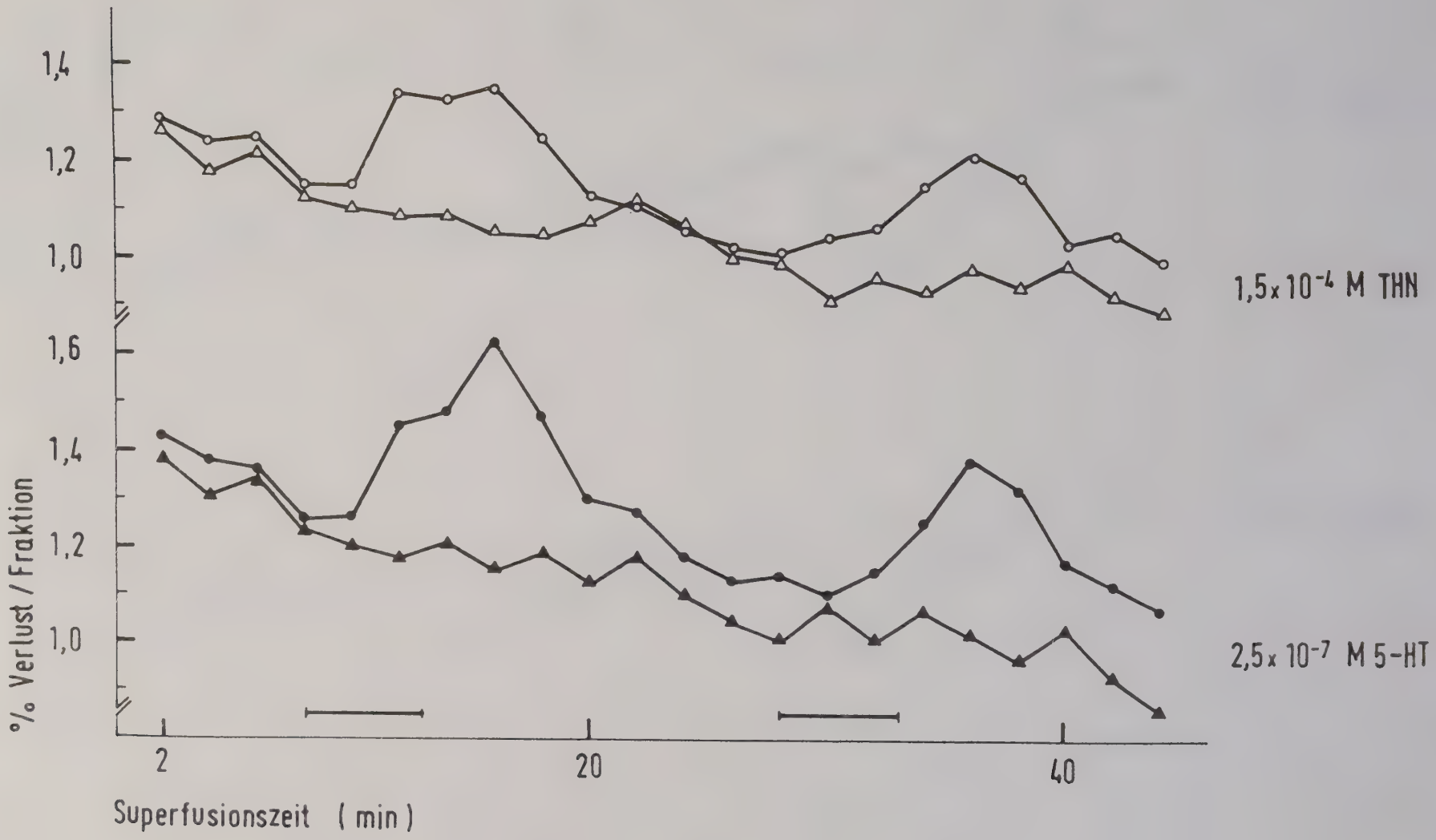
Abb. 26b: Das obere Kurvenpaar zeigt die ^{14}C-Freisetzung nach gleichzeitiger Inkubation mit 1,5 x 10^{-4}M ^{14}C-THN und 2,5 x 10^{-7}M ^{3}H-5-HT
○—○ mit K^+-induzierter Depolarisation (n=8)
△—△ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=4)
Das untere Kurvenpaar zeigt die ^{3}H-Freisetzung unter denselben Bedingungen
●—● mit K^+-induzierter Depolarisation (n=8)
▲—▲ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=4)

Abb. 26c: Das obere Kurvenpaar zeigt die ^{14}C-Freisetzung nach gleichzeitiger Inkubation mit 3 x 10^{-4}M ^{14}C-THN und 2,5 x 10^{-7}M ^{3}H-5-HT

○—○ mit K^+-induzierter Depolarisation (n=6)
△—△ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=2)
Das untere Kurvenpaar zeigt die ^3H-Freisetzung unter denselben Bedingungen
●—● mit K^+-induzierter Depolarisation (n=6)
▲—▲ ohne K^+-induzierte Depolarisation (n=2)

Abb. 26a

% Verlust / Fraktion
1,0
1,2
1,4
1,6
2
20
40
Superfusionszeit (min)
2,5x10-7M 5-HT
8x10-5 M THN


1,4
1,2
1,0
1,6
1,4
1,2
1,0
% Verlust / Fraktion
2
20
40
Superfusionszeit (min)
1,5x10⁻⁴ M THN
2,5x10⁻⁷ M 5-HT

bb. 26b

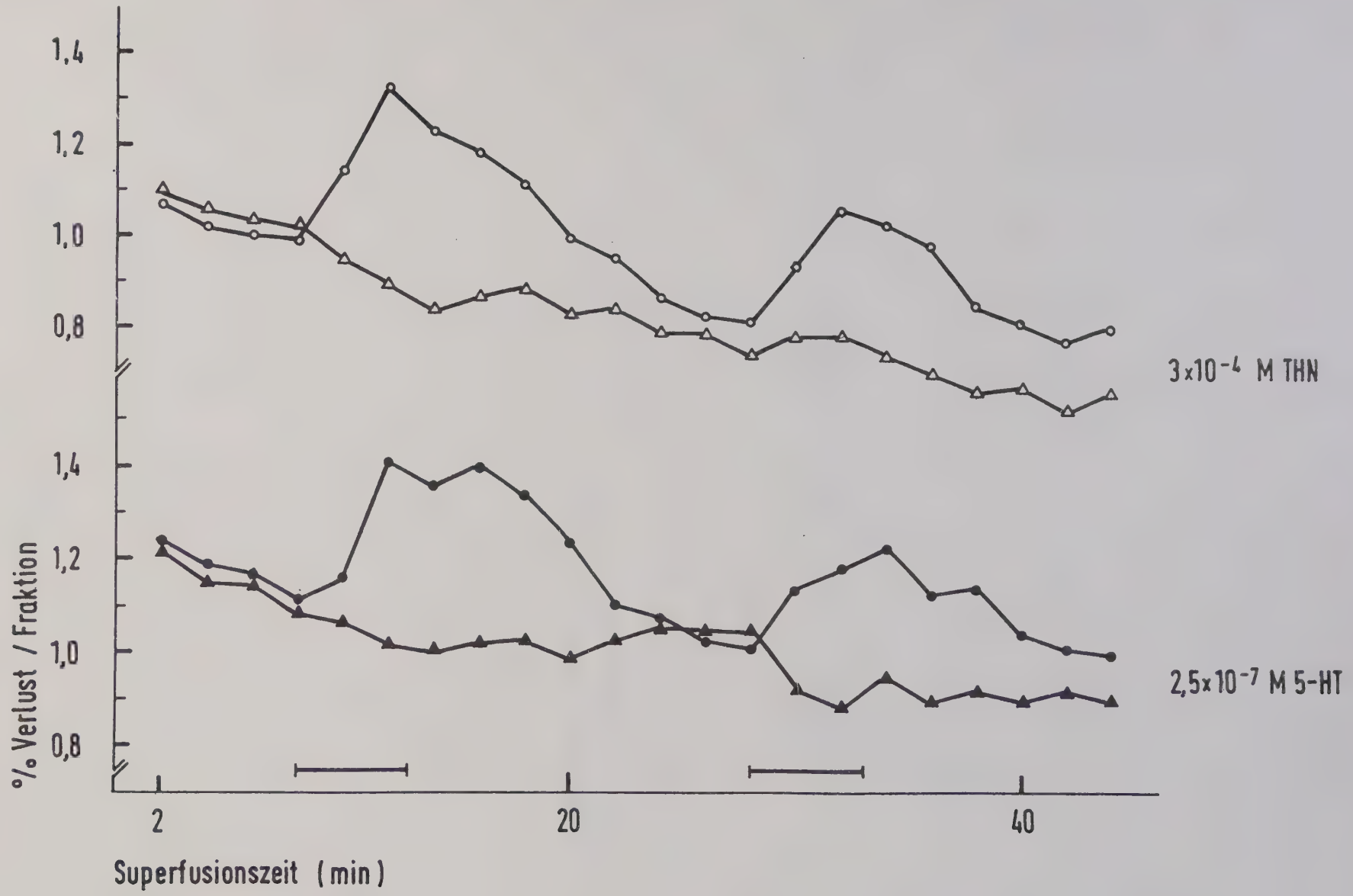

1,4
1,2
1,0
0,8
3x10⁻⁴ M THN
1,4
1,2
1,0
0,8
2,5x10⁻⁷ M 5-HT
% Verlust / Fraktion
2
20
40
Superfusionszeit (min)

Abb. 26c

	S_1		S_2	
	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C
I	131	Ø	108	Ø
II	121	68	83	39
III	138	115	103	98
IV	166	161	121	112

Tab. 5: Werte der planimetrierten Flächen während der ersten und zweiten Stimulationsphase (S_1, S_2) mit 31 mmol/l K^+, jeweils bezogen auf den spontanen Ausstrom der Radioaktivität.
^3H- und ^{14}C-Freisetzung nach Doppelmarkierung mit ansteigender ^{14}C-THN- und konstanter ^3H-5-HT-Konzentration

I : 2,5 x 10^{-7} M ^3H-5-HT ohne ^{14}C-THN
II : 2,5 x 10^{-7} M ^3H-5-HT + 8 x 10^{-5} M ^{14}C-THN
III: 2,5 x 10^{-7} M ^3H-5-HT +1,5x 10^{-4} M ^{14}C-THN
IV : 2,5 x 10^{-7} M ^3H-5-HT + 3 x 10^{-4} M ^{14}C-THN

Abb. 27: ^{3}H- und ^{14}C-Freisetzung nach Doppelmarkierung mit ansteigender ^{14}C-THN- und konstanter ^{3}H-5HT-Konzentration

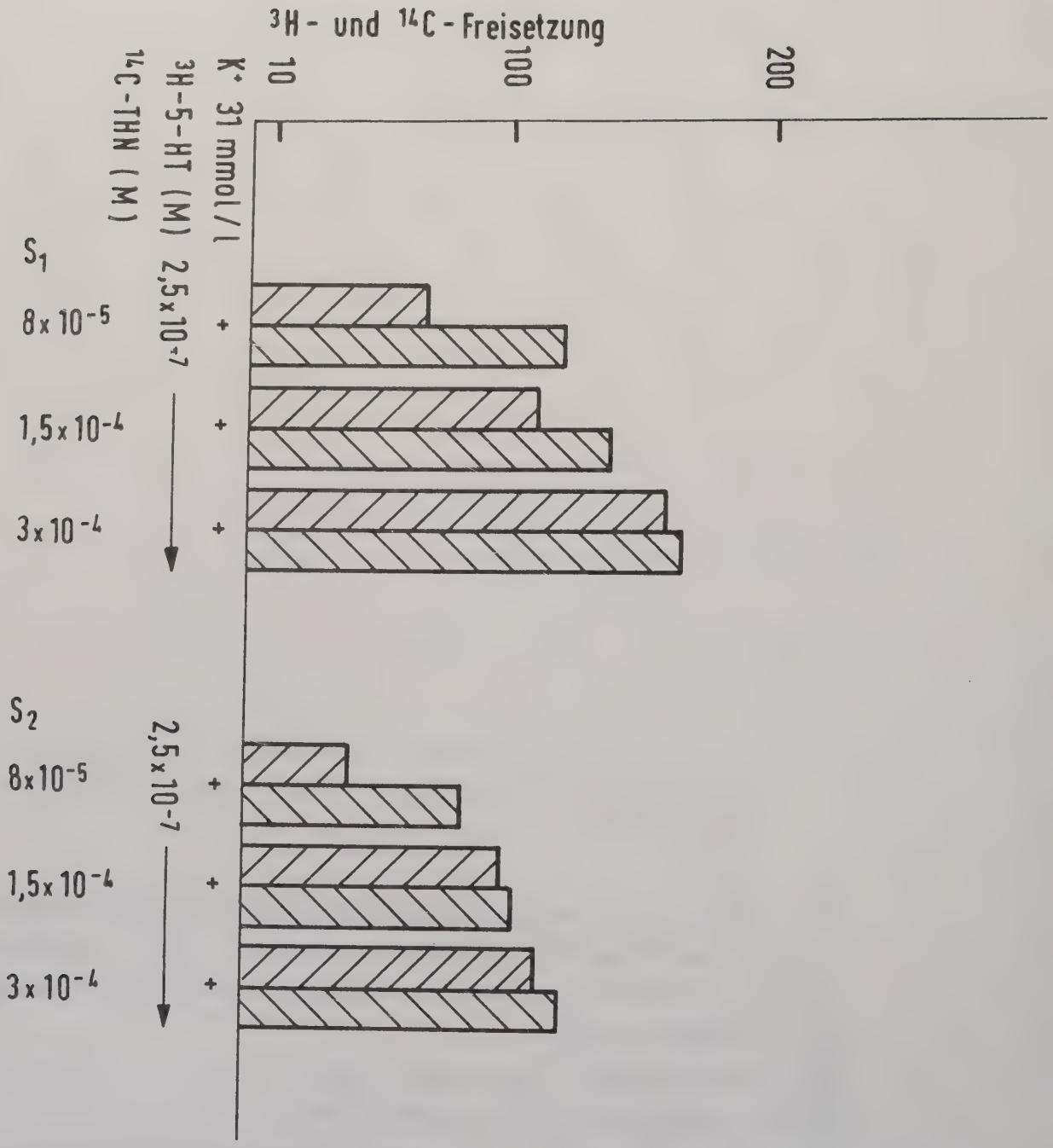
Graphische Darstellung der Werte der planimetrierten Flächen während der K^{+}-induzierten ^{3}H- und ^{14}C-Freisetzung bezogen auf den jeweiligen spontanen Ausstrom der Radioaktivität

▨ K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung

▧ K^{+}-induzierte ^{14}C-Ausschüttung

S_1 und S_2: ^{3}H- und ^{14}C-Ausschüttung während der 1. und 2. Stimulationsphase mit 31 mmol/l K^{+}

Abb. 27


^3H- und ^{14}C-Freisetzung
10
100
200
K+ 31 mmol/l
3H-5-HT (M) 2,5x10-7
14C-THN (M)
S1
8x10-5
1,5x10-4
3x10-4
+
S2
8x10-5
1,5x10-4
3x10-4
2,5x10-7

Diese Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1) THN stimuliert die K^+-induzierte ^3H-5HT-Ausschüttung aus Gewebeschnitten des Hypothalamus der Ratte.

2) Der Betrag an 5-HT, der während einer Depolarisation freigesetzt wird, hängt von der anwesenden THN-Konzentration ab.

3) Beide Substanzen koexistieren höchstwahrscheinlich im gleichen Vesikel, da sie durch die gleichen Mechanismen ausgeschüttet werden.

E. DISKUSSION

E. I. PRÄPARAT UND METHODE

Die Freisetzung von Transmittersubstanzen aus präsynaptischen Nervenendigungen ist ein grundlegender Schritt in der Neurotransmission. Im lebenden Gehirn ist ein Nervenimpuls der physiologische Auslöser. Darauf haben folgende Faktoren Einfluß: endogene Modulatoren, Veränderungen in der Ionenumgebung und die Kontrolle durch prä- und postsynaptische Homöostasemechanismen. Außerdem interferieren neuroaktive Drogen auf verschiedenen Ebenen mit der Neurotransmitterfreisetzung.

Von den untersuchten mutmaßlichen Transmittern sind Katecholamine und 5-HT die am weitesten akzeptierten natürlichen Neurotransmitter. Für diese Gruppe wurde ein spezifisches präsynaptisches Wiederaufnahmesystem beschrieben, das nach der Transmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt zur Inaktivierung führt. Das Interesse an der spezifischen Ausschüttung der Transmitter wuchs mit der Möglichkeit, pharmakologisch auf diesen Prozeß einzuwirken.

Untersuchungen über den Ausschüttungsmechanismus auf zellulärer bzw. subzellulärer Ebene werden an in vivo Präparaten durch die unzureichende Empfindlichkeit der Detektionsmethoden erschwert. Deshalb werden diese Studien bevorzugt an isoliertem Hirngewebe durchgeführt. Bei der Untersuchung präsynaptischer Prozesse sind isolierte Nervenendigungen (Synaptosomen) eine viel genutzte Präparation. Synaptosomen sind ausgerüstet mit dem enzymatischen Inventar für die Synthese der Transmitter und mit den Organellen für ihre Speicherung. Sie sind von einer Plasmamembran umgeben, von der man annimmt, daß sie noch viele charakteristische Eigenschaften der prä- und postsynaptischen Membran in situ enthält (BELLEROCHE & BRADFORD, 1973b; BLAUSTEIN & WEISMANN, 1970; BRADFORD, 1971; LEVI & RAITERI, 1976).

In zahlreichen Studien, die sich mit der Transmitterfreisetzung beschäftigen, werden Gewebeschnitte aus dem Gehirn benutzt (AZZARO & RUTLEDGE, 1973; CHASE et al, 1969; HAMON et al., 1974; NG et al., 1970; ROMMELSPACHER & SUBRAMANIAN, 1979; SUBRAMANIAN & MULDER, 1976). Die Gewebeschnitte stellen im Vergleich zu den Synaptosomen zweifellos eine intaktere Präparation dar, da die meisten Nervenendigungen ihre physiologische räumliche Beziehung zu anderen Gewebeelementen beibehalten.

Bei der Untersuchung der spezifischen Transmitterausschüttung an Gewebeschnitten treten jedoch zwei Nachteile auf:

1.) Die Synapsen machen nur einen kleinen Teil des neuronalen Zwischenraumes aus. Die Transmitter sind auch in anderen neuronalen Strukturen enthalten bzw. können dorthin transportiert werden. Besonderheiten der Zellmembran sind in diesem Gewebeverband unter Umständen schwieriger zu erkennen.
2.) Selbst bei Anwendung der Superfusionsmethode ist es problematisch, die spezifische Wiederaufnahme des freigesetzten Transmitters hinreichend zu verhindern. Die Wiederaufnahme des Transmitters in die benachbarte Präsynapse kann zu falsch negativen Ergebnissen bei der Interpretation der Ausschüttung führen.

Die beiden angeführten Nachteile erschweren die Auswertung der tatsächlichen Ausschüttungsrate sowie den Effekt einer Droge auf die spezifische Ausschüttung. Bei der Untersuchung der spezifischen Ausschüttung eines Transmitters und ihrer Modulation durch bestimmte Drogen muß die spezifische Wiederaufnahme vermieden werden. Wichtige Impulse zur Unterscheidung zwischen tatsächlichen Effekten auf die Ausschüttung und solchen auf die Wiederaufnahme kamen z.B. von HEIKKILA und Mitarbeitern (1975).

Zum einen wurde versucht, dieses Problem technisch zu lösen, wie z.B. von RAITERI und Mitarbeitern (1974), der Synaptosomen in einer Dünnschichtlage in das Superfusionssystem einbrachte. Die Hemmung der spezifischen Wiederaufnahme wurde untersucht für NA, DA, 5-HT, GABA und Glutamant.

REDBURN und Mitarbeiter (1975) wandeln die Superfusionsmethode so ab, daß das Superfusionsmedium mit hoher Durchflußgeschwindigkeit (12- 90 ml/min) in die Gewebebehälter eingespritzt und schnell gesammelt wird. Dabei ist das Gewebe allerdings einem Druck bis zu 1,1 atm ausgesetzt. Der Einfluß dieser Bedingungen ist nicht hinreichend bekannt.

MULDER und Mitarbeiter (1975) schichten über einer kleinen Sephadex G-15 Säule (200 ul) eine Synaptosomensuspension von 50 µl. Auf dieser Sephadexsäule als Träger wird das Gesamtvolumen der Suspension niedriggehalten. Es wird kontinuierlich erneuert bei einer Durchflußrate von 0,25 ml/min. Der Nachteil dieser Methode ist, daß die radioaktiv markierten Synaptosomen nicht direkt auf das Gel appliziert werden können. Die Synaptosomen müssen in einem Zentrifugationsschritt noch einmal gewaschen werden, da sich radioaktive Amine der Inkubationslösung sonst der Sephadexsäule anhaften. Dadurch würde die konstante Rate der freigesetzten Radioaktivität, die normalerweise innerhalb von 20 Minuten erreicht wird, gestört werden.

Von uns wurde während der Superfusion eine Durchflußrate von 0,5 ml/min. gewählt, um damit einen schonenden und schnellen Abtransport der freigesetzten Substanzen zu gewährleisten.

Die Unterscheidung zwischen spezifischer Ausschüttung und spezifischer Wiederaufnahme ist nicht nur ein technisches

Problem. So besteht die Möglichkeit, dem Superfusionsmedium Drogen zuzusetzen, die in ihrer Wirkung als spezifische Hemmstoffe der Wiederaufnahme bekannt sind. Dabei darf nicht außer acht gelassen werden, daß diese Substanzen auch eine zusätzliche Variable in das untersuchte System einführten. So ist z.B. eine Beeinflussung der präsynaptischen Kontrollmechanismen - wie die intraneuronale Transmittersynthese - möglich. Allerdings wird die spezifische Ausschüttung des Transmitters nicht beeinflußt unter Bedingungen, die die spezifische Wiederaufnahme um 80 - 95 % hemmen (RAITERI et al., 1976). Außerdem wird der mit Hilfe der Superfusion ausgeschüttete oder diffundierte Transmitter sofort abtransportiert, so daß seine Konzentration im Bereich der präsynaptischen Rezeptoren kaum ausreicht, um die Synthese zu beeinflussen.

Der von uns eingesetzte Hemmstoff der spezifischen Wiederaufnahme, CGP 6085/A, führt im Konzentrationsbereich von 1×10^{-6} - 5×10^{-6}M zu einer vollständigen Hemmung der spezifischen Wiederaufnahme. Die IC_{50} beträgt 2×10^{-8}M. Die angewandte Konzentration von 3×10^{-8}M wurde etwas über der IC_{50} gewählt, um den Effekt auf die spezifische Ausschüttung durch den Inhibitor gering zu halten. Es zeigt sich in den abgebildeten Kurvenverläufen, daß der Inhibitor auf den spontanen ^{14}C- und ^{3}H-Ausstrom keinen Einfluß hat (siehe z.B. Abb. 14, $\triangle$—$\triangle$). Unter diesen Versuchsbedingungen ist CGP 6085/A während der Stimulationsphase allein zugesetzt. Offensichtlich braucht eine spezifische Wiederaufnahme der freigesetzten Substanz nicht in weitere Überlegungen einbezogen zu werden. Dies gilt auch dann, wenn der Einfluß von THN auf die K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung in diesem experimentellen System untersucht wird.

II. SPEZIFITÄT DER TRANSMITTERAUSSCHÜTTUNG

Die Möglichkeit, daß bei in vitro Experimenten eine angebotene radioaktivmarkierte Transmittersubstanz in Neurone aufgenommen wird, die normalerweise diesen Transmitter nicht enthält, läßt sich nicht ausschließen (IVERSEN, 1970 b).

Diese unspezifische Markierung von Neuronen kann minimiert werden, indem man ausgewählte Hirnareale und niedrige Konzentrationen der radioaktiven Transmittersubstanz verwendet. Beide Voraussetzungen wurden mit unseren Versuchen erfüllt. Für 5-HT ist beispielsweise bekannt, daß es in niedriger Konzentration spezifisch in serotonergen Neuronen akkumuliert wird, während es in hoher Konzentration auch in katecholaminergen Nervenendigungen aufgenommen wird (SNYDER et al., 1970).

Es wird allgemein akzeptiert, daß die Transmitter zum größten Teil in den synaptischen Vesikeln gebunden und gespeichert sind. Normalerweise liegen nur geringe Anteile in einer freien Form im Cytoplasma vor. Diese Lokalisation unterscheidet die untersuchten Transmitter von anderen mutmaßlichen Transmittern, wie z.B. Aminosäuren (BELLEROCHE & BRADFORD, 1973 a).

In diesen Zusammenhang gehören auch die speziellen Aspekte des Transportes, des Metabolismus und der Interaktion mit pharmakologischen Agentien:

1.) Die Transmitterausschüttung durch Exocytose setzt eine vesikuläre Speicherung voraus.
2.) Die Speicherung in den synaptischen Vesikeln schützt die Transmitter vor der Desaminierung durch MAO.
3.) Einige Drogen haben einen spezifischen Effekt auf die vorgenannten Speichervesikel, wie z.B. Reserpin.

Die Kompartimentierung innerhalb der Neurone ist mit den Termini 'vesikulär' und 'cytoplasmatisch' noch nicht ausreichend beschrieben. Es konnte gezeigt werden, daß ein neu-synthetisierter Transmitterpool funktionell andere Eigenschaften hat als ein bereits vorhandener Transmitterpool. In in vitro- und in vivo-Experimenten wird ersterer bei der spontanen und Depolarisations-induzierten Ausschüttung bevorzugt freigesetzt (BELLEROCHE et al., 1976; KOPIN et al., 1968).

Schließlich wird noch ein weiterer Aspekt von McBRIDE und Mitarbeitern (1976) eingeführt, die am Beispiel von Serotonin zeigen, daß neu-synthetisiertes und neu-wiederaufgenommenes 5-HT in gleichem Maße an der Ausschüttung teilnehmen. Die Ungewißheit der Verteilung des radioaktiven Transmitters im Verhältnis zum endogenen Transmitter ist sicherlich ein Nachteil der Ausschüttungsstudien.

In unseren Untersuchungen wurde durch Hinzufügen von CGP 6085/A, ein Hemmstoff der spezifischen Wiederaufnahme, das bereits dargestellte Problem der Wiederaufnahme des freigesetzten Transmitters vermieden. Ein Hinweis auf die Transmitterlokalisation wird am Beispiel der Reserpin-Vorbehandlung noch diskutiert.

Für die Ausschüttung des Transmitters sind zwei generelle Wege denkbar: zum einen ein direkter Transport aus dem synaptischen Vesikel durch exocytotische Mechanismen (ZIMMERMANN, 1979), zum anderen die Freisetzung in das Cytoplasma aus dem synaptischen Vesikel und ein anschließender Weitertransport über die Barriere der Plasmamembran durch einfache Diffusion oder durch Carrier-gebundenen Transport (BIRKS, 1974; DUNANT & ISRAËL, 1979; MARCHBANKS, 1977 und 1978). BOGDANSKI (1976) sieht dabei die Bedeutung des Calciums in der Mobilisierung der Transmitter aus den Vesikeln. Die Funktion der Vesikel wird in diesem Konzept auf eine Speicherung beschränkt (TAUC, 1979). Während der erstgenannte Transportweg durch Depola-

risation induziert wird, ist die Carrier-gebundene Ausschüttung durch andere Stimuli auslösbar. Dieser zweite Weg wird diskutiert für die THN-Wirkung auf die 5-HT-Ausschüttung.

Für die durch Depolarisation induzierte spezifische Ausschüttung eines Transmitters aus Gewebeschnitten ist es notwendig, daß ein quasi physiologischer Stimulus gegeben wird. Zahlreiche Arbeitsgruppen erzielen mit elektrischer Stimulation eine selektive Ausschüttung mutmaßlicher Transmitter (De ILVAIN & SNYDER, 970; ORREGO & MIRANDA, 1977; BALDATH & ORREGO, 1975).

In unseren Experimenten wurde eine erhöhte extrazelluläre K^+-Konzentration als spezifisches Ausschüttungsagens eingesetzt. Die Anwendung von Kaliumionen als ein effektiver Stimulus zur spezifischen Ausschüttung von Transmittern ist in zahlreichen Untersuchungen bestätigt worden (zur Übersicht siehe: ORREGO, 1979 und LEVI & RAITERI, 1976). Dabei wird in einem Konzentrationsbereich von 40 - 56 mM K^+ für ca. 10 Minuten eine spezifische Ausschüttung durch einen exocytotischen Prozeß beschrieben (MULDER & SNYDER, 1974; MULDER et al., 1974, [illegible] et al., 1975, RAITERI et al., 1975).

In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß niedrige K^+-Konzentrationen günstigere Versuchsbedingungen schaffen, da eine Modulation der Ausschüttung durch präsynaptische Rezeptoren von der Intensität des K^+-Stimulus abhängig ist (OSBORNE & HERZ, 1980). Unter diesem Gesichtspunkt wurde die K^+-Konzentration von 56 mM (ROMMELSPACHER & SUBRAMANIAN, 1979) in unseren Experimenten auf 31 mM herabgesetzt. Das entsprach der niedrigsten K^+-Konzentration, mit der noch

ein deutlicher Stimulationseffekt zu erzielen war. Die Dauer der Depolarisationszeit wurde von 10 auf 5 Minuten verkürzt.

Nach BENNET und Mitarbeitern (1974) scheint die K^+-Depolarisation für die Transmitterausschüttung spezifischer zu sein als elektrische Stimulation. So kann z.B. Glycin durch hohe K^+-Konzentration aus Gewebeschnitten des Rückenmarks freigesetzt werden. Dagegen wurde aus dem Kortex nur sehr wenig Glycin ausgeschüttet. Elektrische Stimulation der Gewebeschnitte aus Rückenmark und Kortex führte zu einer Ausschüttung fast aller untersuchten Aminosäuren.

Die Stimulation durch hohe K^+-Konzentration hat außerdem den Vorteil, in der Durchführung einfacher zu sein als elektrische Stimulation. Allerdings werden damit auch Substanzen aus Gliazellen und löslicher intraneuronaler Lokalisation aktiv transportiert. Da in den meisten Fällen auch eine Form der Ca^{++}-Abhängigkeit besteht, wurde der Begriff der echten- und pseudo-Ca^{++}-Abhängigkeit eingeführt. VARGAS und ORREGO (1976) wählten NA und α-Aminoisobuttersäure (AIB) als Modellsubstanzen für einen Transmitter und eine Aminosäure ohne Transmittereigenschaften. So werden NA und AIB durch hohe K^+-Konzentrationen von 16 - 56 mM gleichzeitig ausgeschüttet. Dieser Prozeß ist durch niedrige Ca^{++}-Konzentrationen hemmbar. Während jedoch die Ausschüttung von NA in Abhängigkeit von der externen Ca^{++}-Konzentration im Bereich von 1,5 bis 2 mM Ca^{++} entsprechend ansteigt, zeigt die Ausschüttung von AIB bei 0,2 mM Ca^{++} bereits eine Sättigung. Der Ca^{++}-Einfluß auf die NA- und AIB-Ausschüttung sind Beispiele für eine echte- und pseudo-Ca^{++}-Abhängigkeit.

Der von uns getestete Ca^{++}-Konzentrationsbereich von 1,27 bis 2,54 mM und die in Abhängigkeit davon stimulierbare ^{14}C-Ausschüttung entsprechen einer echten Ca^{++}-Abhängigkeit.

Für THN wird damit eine weitere Eigenschaft eines mutmaßlichen Transmitters geliefert. Für 5-HT wurde die Ca^{++}-Abhängigkeit der Ausschüttung von MULDER und Mitarbeitern (1975) bereits nachgewiesen.

Von VARGAS und Mitarbeitern (1977) wurde die Beobachtung gemacht, daß die K^+-induzierte Ausschüttung von exogen zugeführten radioaktiven Transmittersubstanzen lokalisationsbedingte typische Unterschiede im Kurvenverlauf zeigt. Bei löslicher intraneuronaler Lokalisation zeigt die Kurve eine maximale Ausschüttung höchstens 4 Minuten nach Beginn der Superfusion mit hoher K^+-Konzentration. Trotz fortbestehender hoher K^+-Konzentration folgt dann ein stetiger Abfall der Ausschüttungsrate, bis die Basislinie wieder erreicht ist.

Bei der Ausschüttung aus den Gliazellen wird die maximale Ausschüttungsrate 10 Minuten nach Einwirken der hohen K^+-Konzentration erreicht und aufrechterhalten bis die Superfusion mit verminderter K^+-Konzentration wieder aufgenommen wird.

Demgegenüber tritt in unseren Versuchsreihen bei 5minütiger Stimulationsdauer die Kurvenakme 4 - 8 Minuten nach Stimulationsbeginn auf. Der Kurvenabfall ist in der Regel steil und erreicht nach ca. 6 Minuten die Basislinie.

Um weitere Information über den Ursprung des freigesetzten Transmitters zu erhalten, wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen Reserpin angewandt (COLBURN & KOPIN, 1972; REDBURN et al. 1979). Reserpin verhindert die Aufnahme und/oder Speicherung im Vesikel und führt dadurch zur Transmitterentleerung der Nervenendigungen. Reserpin-behandeltes Gewebe zeigt nur geringe Transmitterbindung innerhalb der Vesikel. Der unter

diesen Bedingungen nachgewiesene cytoplasmatische Transmitter nimmt nicht an der normalen Neurotransmission teil und führt auch nicht zu den üblichen postsynaptischen Zellreaktionen. Es wird angenommen, daß Reserpin an noradrenergen, dopaminergen und serotonergen Neuronen in der gleichen Art und Weise wirkt (zur Übersicht siehe: SLOTKIN, 1974).

Bei Zugabe von Reserpin zum Superfusionsmedium beobachtet man eine Freisetzung des bereits vesikulär gespeicherten Transmitters. Dabei spielt allerdings eine direkte Wirkung auf die spezifische Ausschüttung des Transmitters keine wesentliche Rolle (COLBURN & KOPIN, 1972). Vielmehr greift das Alkaloid in das Gleichgewicht zwischen cytoplasmatischem und vesikulären Transmitter ein. Dieses dynamische Gleichgewicht, das normalerweise die Speicherung des Amins begünstigt, wird durch Reserpin zum Cytoplasma hin verschoben; Ursache dafür ist die behinderte Aufnahme des Amins in die Vesikel. Im Cytoplasma ist das Amin einer weitgehenden Metabolisierung durch MAO ausgesetzt, so daß die gesteigerte Freisetzung der Radioaktivität vollständig zu Lasten des desaminierten Metaboliten geht, der wahrscheinlich durch die Plasmamembran diffundiert. Die cytoplasmatische Anreicherung des Amins führt möglicherweise über eine Endproduktheмmung zur Herabsetzung einer weiteren Syntheserate (SPECTOR et al., 1967).

Bei der in vivo und in vitro Anwendung von Reserpin ist zu beachten, daß die Dosis möglichst niedrig gewählt wird, da Dosen, die zur Inaktivierung der vesikulären Speicherung eingesetzt werden, bereits zu Veränderungen der Neuronenmembran und der intraneuronalen Mitochondrien führen können (MAXWELL et al., 1976).

Abbildung 13 zeigt, daß die in vivo Reserpin-Behandlung die K^+-induzierte ^{3}H-5HT-Ausschüttung aus Gewebeschnitten des Hypothalamus in vitro blockiert. Der spontane Ausstrom an

^{3}H-5-HT ist dabei nicht erhöht. Auch SEGAWA und Mitarbeiter (1978 a) finden keine signifikante Erhöhung der spontanen ^{3}H-5HT-Ausschüttung durch Reserpin-Behandlung, ohne diese Beobachtung zu erklären.

Die Reserpin-Vorbehandlung wurde in unseren Experimenten in Anlehnung an ROSS (1979) durchgeführt. In diesen Experimenten führt Reserpin zu einer Steigerung des spontanen Ausstroms von ^{3}H-NA aus kortikalen Gewebeschnitten und, wenn auch in geringerem Ausmaß, von ^{3}H-DA aus Gewebeschnitten des Corpus striatum. Das Ergebnis läßt sich dahingehend interpretieren, daß die extravesikulären Bindungsstellen in zentralen dopaminergen Neuronen zahlreicher sind als in noradrenergen. Diese höhere Anzahl extravesikulärer Bindungsstellen ist auch für die serotonergen Neurone vorstellbar, da eine genaue Verteilung der Transmitter zwischen Vesikel und Cytoplasma weder bei normalen noch Reserpin-behandelten Neuronen bekannt ist. Der cytoplasmatische Anteil beider Neuronen-Gruppen könnte gleich hoch sein, auch wenn der Gehalt an Transmitter in der Kontrollgruppe mehr als doppelt so hoch ist.

Das Ergebnis nach der Reserpin-Behandlung unterstützt die Hypothese, daß vesikulärgebundene Transmitter die sofort verfügbare Quelle der chemischen Neurotransmission sind.

REDBURN und Mitarbeiter (1979) schließen aus entsprechenden Ergebnissen, daß zwei vesikuläre Transmitterpools in der Reserpin-Wirkung von Bedeutung sind. Der eine nimmt als Reserpin-resistenter Speicher nicht direkt an der Ca^{++}-abhängigen Transmitterfreisetzung teil, zumal der hemmende Effekt auf die Ausschüttung nicht einer vollständigen Entleerung sämtlicher vesikulärer Speicher zuzuschreiben ist. Die Verabreichung von Reserpin in vivo führt bei einer Entleerung der Vesikel über 90 % zu deutlichen Veränderungen in der Neurotransmission. Der Reserpin-Effekt wird den Vesikeln zugeschrieben, die der Oberflächenmembran am nächsten liegen (Kirshner et al., 1979).

In Gegenwart des MAO-Hemmers Pargylin ist der Reserpin-Effekt deutlich herabgesetzt. Die Reserpin-bedingte Verschiebung von vesikulärer zu cytoplasmatischer Speicherung ist weniger ausgeprägt, wenn das cytoplasmatische Amin nicht kontinuierlich durch Desaminierung beseitigt wird.

Wir verzichteten in unseren Experimenten auf den Zusatz des MAO-Inhibitors Pargylin , da die Ergebnisse nach Reserpin-Vorbehandlung nahelegen, daß sich die untersuchten Substanzen in den Vesikeln lokalisieren lassen. Da der Abbau durch MAO im Cytoplasma stattfindet, sind die Transmitter durch die Aufnahme in die Speichergranula vor diesem cytoplasmatischen Prozeß geschützt (LANGEN & MULDER, 1979). Auch andere Arbeitsgruppen (MULDER et al., 1979) haben MAO-Hemmstoffe nicht angewandt, um die Kompartimentierung des Transmitters nicht zu beeinflussen. Auch ohne MAO-Hemmstoffe besteht die gesammelte Radioaktivität zum größten Teil aus nicht-metabolisiertem Transmitter (LANGEN & MULDER, 1980).

MULDER und Mitarbeiter (1975) und RAITERI und Mitarbeiter (1975) weisen nach, daß 75 - 100 % der durch Depolarisation freigesetzten Radioaktivität aus nicht-modifiziertem Neurotransmitter besteht. Das entspricht unseren Ergebnissen, wonach 20 - 30 % der Radioaktivität 5-HIAA entspricht, dem Abbauprodukt des Serotonins (unveröffentlichte Ergebnisse).

E III. THN-EINFLUSS AUF DIE 5-HT-AUSSCHÜTTUNG

Der Einfluß von THN auf serotonerge Neurone wurde zunächst durch Zugabe von THN zum Superfusionsmedium geprüft. Dabei zeigt THN in Abhängigkeit von der Konzentration einen modulierenden Effekt auf die ^{3}H-Ausschüttung. Auf die K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung wirkt THN in niedriger Dosierung hemmend und in hoher Dosierung zunehmend stimulierend bis ein Plateau erreicht wird. Unabhängig von der Konzentration ist immer ein schneller Eintritt der Wirkung zu beobachten. Aufgrund dieser Effekte könnte THN ein Modulator an zentralen serotonergen Neuronen sein.

Für Neurone und Gliazellen sind zahlreiche Substanzen bekannt, wie beispielsweise neutrale und saure Aminosäuren, für die eine Rolle als Modulator im ZNS diskutiert wird. Charakteristische Eigenschaften dieser Substanzen sind nach ORREGO (1979):

1) Ihre extrazelluläre Zufuhr beeinflußt die Aktivität der Neurone.

2) Sie sind in der Regel nicht in Vesikeln gebunden.

3) Sie werden aktiv akkumuliert durch Na^{+}-abhängige Transportsysteme, die in der Plasmamembran von Neuronen und Gliazellen lokalisiert sind.

4) Ihr zellulärer Ausstrom, und damit die Stärke ihres Effektes, ist abhängig von der neuronalen Aktivität und der extrazellulären K^{+}-Konzentration.

Eine Zuordnung des THN zur Gruppe der Modulatoren erscheint aufgrund dieser Eigenschaften vertretbar. Fraglich wird sie dadurch, daß sich auch die beteiligten Ausschüttungsmechanismen der Modulatoren wesentlich von denen der Transmitter unterscheiden (ORREGO, 1979). Danach zeigen Transmitter einen raschen Wechsel des Aktivitätsmusters und sind abhängig von einer steigenden Konzentration des ionisierten Calciums im Cytoplasma. Dagegen ist die Ausschüttung des Modulators unabhängig von Calcium und eine Wirkungsänderung über die Zeit möglicherweise verlangsamt. Gemeinsam ist der Gruppe des Modulatoren nach FLOREY (1960), daß sie neuronale Funktionen beeinflussen und nicht im synaptischen Vesikel vorkommen.

Diese Charakterisierung bleibt für THN unzureichend, zumal aus unseren Experimenten Hinweise dafür vorliegen, daß THN in vesikulär-gebundener Form vorliegt. Außerdem zeigt der THN-Effekt eine Abhängigkeit von der Ca^{++}-Konzentration und führt zu einem schnellen Wirkungseintritt bei extrazellulärer Zufuhr.

Nach diesen Experimenten allein kann THN nicht als Modulator charakterisiert werden. Aber es bleibt die Frage zu beantworten, über welche Mechanismen THN modulierend wirkt.

Für die Transmitterausschüttung aus noradrenergen, dopaminergen und serotonergen Neuronen des ZNS konnte eine lokale negative Feedback-Kontrolle nachgewiesen werden. Vermittelt wird dieser Kontrollmechanismus über spezifische Rezeptoren, die pharmakologisch den postsynaptischen α-Rezeptoren entsprechen. Man stellt sie sich auf oder nahe den Varicositäten vor. Eine Aktivierung dieser präsynaptischen Autorezeptoren reduziert die Menge des freigesetzten Transmitters (STARKE & ENDO, 1976). Das Vorkommen wie auch die Wirkungsweise dieser präsynaptischen Rezeptoren, die modulierend auf die Transmitter-Ausschüttung wirken, wird meist indirekt untersucht über Drogen, deren mehr oder weniger spezifische Interaktion mit diesem Rezeptortyp bekannt ist. So führen Drogen, die bekannt sind als Agonisten der α-Adrenozeptoren zu einer Hemmung und Antagonisten zu einer Steigerung der spezifischen Ausschüttung (DISMUKES et al., 1977).

MULDER und Mitarbeiter (1979) haben den Einfluß von drei Katecholaminen: NA, DA und Adrenalin, die alle in unterschiedlicher Konzentration und regionaler Verteilung im Gehirn vorkommen, auf die ^{3}H-NA-Ausschüttung in vitro untersucht. NA und Adrenalin führten bei einer Konzentration von 1 μM zu einer direkten Hemmung der NA-Ausschüttung, während DA keinen signifikanten Effekt zeigte. Im Falle von DA führt die Aktivierung der präsynaptischen Rezeptoren nicht zu einer direkten Hemmung der K^{+}-induzierten Ausschüttung des Transmitters. Die Regulation der spezifischen DA-Ausschüttung geschieht möglicherweise indirekt über die Kontrolle der Tyrosinhydroxylierung durch die präsynaptischen Rezeptoren (RAITERI et al., 1979).

FOZARD (1979) und GÖTHERT und Mitarbeiter (1979) haben nachgewiesen, daß 5-HT-Rezeptoren, auch Tryptamin-Rezeptoren ge-

nannt, an synaptischen Nervenendigungen des Kaninchenherzens vorkommen. Die Aktivierung dieser Rezeptoren beeinflußt dort die Ca^{++}-abhängige NA-Ausschüttung. 5-HT hemmt diese Transmitterausschüttung wahrscheinlich über eine selektive antagonistische Aktivität an diesen neuronalen Rezeptoren. Dieser Effekt scheint ebenfalls dosisabhängig zu sein, da mit höheren 5-HT-Dosen eine gesteigerte ^{3}H-Ausschüttung erzielt wurde.

Auch für NA ist, in Abhängigkeit von der Dosis, eine unterschiedliche Wirkung auf präsynaptische Rezeptoren bekannt. Allerdings werden in diesem Konzept durch niedrige NA-Konzentrationen selektiv ß-Rezeptoren aktiviert, die die Ausschüttung pro Impuls steigern, während erhöhte NA-Konzentrationen über den α-adrenergen negativen Feedback-Mechanismus die Ausschüttung pro Impuls vermindert. Bisher konnten die ß-Rezeptoren nur an wenigen Neuronen nachgewiesen werden (zur Übersicht siehe: STARKE et al., 1977).

Aus diesen zum Teil noch widersprüchlichen Ergebnissen läßt sich zusammenfassend sagen, daß die präsynaptischen α- und ß-Rezeptoren Glieder eines lokalen synaptischen Feedback-Mechanismus sind. Dabei hemmt ein Transmitter bzw. eine strukturverwandte Substanz über die Aktivierung der präsynaptischen α-Rezeptoren die eigene weitere Ausschüttung.

Dieses hypothetische Konzept läßt sich auf unsere Ergebnisse übertragen im Sinne eines Hemmeffektes niedriger THN-Konzentrationen, während höhere THN-Konzentrationen die ^{3}H-Ausschüttung steigern. Dieser Effekt tritt in einem Konzentrationsbereich auf, in dem andere Substanzen über α-Rezeptoren die NA-Ausschüttung modulieren 5×10^{-8} - 10^{-5} M (DISMUKES et al., 1977). Zur Zeit muß noch offenbleiben, ob über einen Rezeptor

in Abhängigkeit von der Konzentration unterschiedliche Effekte vermittelt werden oder ob verschiedene Rezeptoren zur Verfügung stehen.

Die Ca^{++}-Abhängigkeit dieser THN-Wirkung läßt Rückschlüsse auf die beteiligten Wirkungsmechanismen zu. Es wäre denkbar, daß dieser Effekt nicht einfach über die Blockade des Ca^{++}-Einstroms durch unspezifische Ca^{++}-Kanäle zustande kommt, die dann auch durch alle möglichen Ca^{++}-abhängigen Stimulationen geöffnet werden könnten. Vielmehr müssen spezifische Ca^{++}-Kanäle vorhanden sein, die durch diese Rezeptoraktivität geöffnet werden. Diese Annahme schließt nicht aus, daß der Rezeptor auch Ort der Wirkung ist, da Bindungsort der Droge und Ca^{++}-Kanäle im gleichen Makromolekül vorkommen und koordiniert werden (ROBERTIS, 1975). Zu prüfen bleibt darüberhinaus, ob die THN-Wirkung über eine Änderung der Syntheserate, wie im Falle des DA, zustande kommt.

Schließlich bleibt die Bedeutung des cAMP für den THN-Effekt zu diskutieren. An noradrenergen Neuronen werden gesteigerte cAMP-Spiegel als mögliche Vermittler der ß-adrenergen Wirkung angenommen (ADLER-GRASCHINSKY & LANGER, 1975).

Aufgrund dieser Ergebnisse läßt sich das einfache Schema der Erregungsübertragung wie es in Abbildung 1 dargestellt wurde, auf folgende Weise ergänzen:

Abb. 28: Schematische Darstellung des präsynaptischen Feedback-Mechanismus, durch den die Ausschüttung und die Synthese der biogenen Amine in zentralen Neuronen kontrolliert werden (nach RAITERI et al., 1979).

V = Vorstufen der Transmittersynthese
T = Transmitter
C = membran-gebundener Carrier
R = postsynaptischer Rezeptor
— — ▶ = Hemmung der Transmittersynthese (1) oder -ausschüttung (2), die jeweils über präsynaptische Rezeptoren vermittelt wird
..... ▶ = Endprodukthemmung der Transmittersynthese.

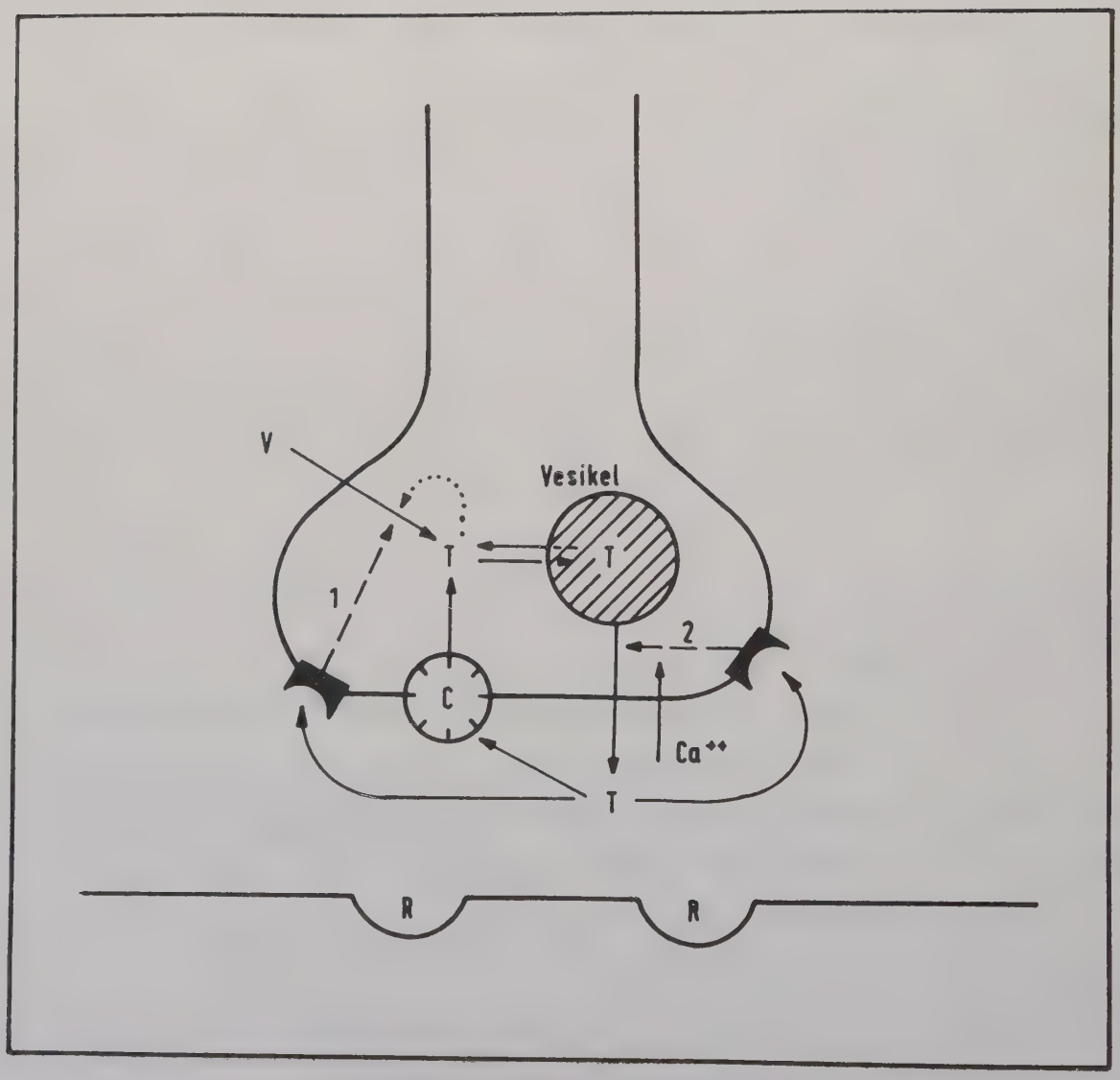


Abb. 28: Schematische Darstellung des präsynaptischen Feedback-Mechanismus

Ein interessantes Ergebnis unserer Untersuchungen über den THN-Einfluß auf die ^{3}H-5HT-Freisetzung ist die stimulierende Wirkung auf den spontanen ^{3}H-5HT-Ausstrom.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt läßt sich noch nicht sagen, ob der in vitro beobachtete spontane Ausstrom mit dem spontanen Transmitterausstrom des Gehirns in vivo korreliert. Es ist wahrscheinlich, daß ein noch unbestimmter Anteil des spontanen Ausstroms durch 'Auslaufen' beschädigter Partikel verursacht wird. Der spontane Ausstrom wird auch damit erklärt, daß Vesikel zufällig mit der Membran kollidieren und so den Transmitter direkt freisetzen. Dieser Prozeß wäre qualitativ mit dem während einer Depolarisation vergleichbar (RAITERI et al., 1977). Der spontane Ausstrom unterscheidet sich in einigen untersuchten Merkmalen, wie z.B. in der Abhängigkeit von Temperatur, Na^{+}-Konzentration und Carrier-Blockade, von denen des stimulierten Ausstroms (LEVI & RAITERI, 1976).

In unseren Experimenten ist der spontane Ausstrom unabhängig von hohen K^{+}-Konzentrationen. Er ist dosisabhängig durch THN stimulierbar, und dieser Effekt ist Calcium-abhängig. Diese THN-Wirkung ist über zwei unterschiedliche Wege vorstellbar:

1.) Auswärtstransport durch membran-gebundene Austauschprozesse
2.) Wirkung über die membran-gebundene Na^{+}-K^{+}-aktivierbare ATPase.

ad 1) Verschiedene Arbeitsgruppen haben das Vorhandensein von Homo- und Heteroaustauschprozessen auf der Stufe der Neuronenmembran nachgewiesen (LEVI et al., 1976; PATON, 1973; SELLSTROM et al., 1976). Von SIMON und Mitarbeitern (1974) wurde ein Carrier-vermittelter Homoaustausch von intra- und extrazellulärem GABA nachgewiesen. DIEZ und Mitarbeiter (1976) untersuchten als Beispiel eines Heteroaustauschprozesses Tryptophan und

L-DOPA. Es wird vermutet, daß diese Carriersysteme, soweit sie zum spontanen Transmitterausstrom beitragen, eine geringere Affinität zum Transmitter haben als die Carriersysteme, die die spezifische Ausschüttung vermitteln. Möglicherweise sind unspezifische Carrier beteiligt, die auch Aminosäuren ohne Transmittereigenschaften transportieren.

Inwieweit eine passive Diffusion an dem Auswärtstransport durch die Plasmamembran beteiligt ist, wird widersprüchlich diskutiert. Da die Transmitter bei physiologischen pH-Werte ionisiert vorliegen, ist es wahrscheinlicher, daß ein Membrantransportsystem beteiligt ist. Gegen eine passive Diffusion spricht auch die Beobachtung, daß der Anstieg der Transmitterkonzentration im Cytoplasma zwar zu einem beschleunigten Austauschprozeß führt, daß dieser Konzentrationsanstieg allein jedoch nicht ausreicht, um den Transport aus der Zelle wesentlich zu steigern. Das zeigen Experimente, in denen der Reserpineinfluß auf die 5-HT-Freisetzung bei gleichzeitiger MAO-Hemmung verhindert wurde (RAITERI et al., 1977).

In Experimenten von COLBURN und KOPIN (1972) wurde der Einfluß von Tyramin auf den spontanen NA-Ausstrom untersucht. Dieser erfolgte durch beschleunigten Abtransport von cytoplasmatisch gebundenem NA, das größtenteils nicht metabolisiert war. Den Transport aus der Zelle vermittelten Austauschprozesse an der Plasmamembran. Da Tyramin intrazellulär wirkt, gilt dieser Mechanismus nicht für die THN-Wirkung auf den spontanen ^{3}H-5HT-Ausstrom. Außerdem müßte die Konzentration an 5-HT abnehmen, wenn bei der Freisetzung eine Verdrängung aus den Speicherorten eine Rolle spielen würde. In unseren Experimenten führt die THN-Zugabe zu einem Anstieg des spontanen ^{3}H-5HT-Ausstroms. Es bleibt die Frage inwieweit der 5-HT-Austritt aus der Nervenzelle erleichtert wird über einen durch Austausch beschleunigten Diffusionsprozeß. An diesem Prozeß könnten unspezifische Carrier im Sinne des beschriebenen Heteroaustauschprozesses beteiligt sein.

ad 2) Als zweite Möglichkeit bleibt zu diskutieren, ob THN durch einen Einfluß auf die membran-gebundene Na^+-K^+-aktivierbare ATPase den spontanen ^{3}H-5HT-Ausstrom erhöht. Zahlreiche Substanzen wie Ouabain, Chlorpromazin und Calcium sowie Na^+- und K^+-Entzug hemmen die Aktivität der Na^+-K^+-aktivierbaren ATPase und steigern dadurch die Freisetzung verschiedener Transmitter (SCHWARTZ et al., 1975; SKOU, 1965). Mit Äthanol kann durch entsprechende Wirkung der spontane Ausstrom von DA, 5-HT und GABA gesteigert werden (CARMICHAEL & ISRAEL, 1975).

Die Effekte der ATPase-Hemmung auf die Transmitterfreisetzung wurden hauptsächlich am spontanen Ausstrom untersucht und nicht an der durch Depolarisation-induzierten Ausschüttung. Die Ursache liegt darin begründet, daß bei einer Hemmung der membran-gebundenen ATPase die intrazelluläre Na^+-Konzentration ansteigt. Dadurch wird eine weitere Reizleitung beeinträchtigt. Es wäre schwierig und auch irreführend, eine stimulationsabhängige Veränderung zu beurteilen, wenn die Reizleitung bereits gestört ist (VIZI, 1978).

Die vorübergehende Hemmung der membran-gebundenen ATPase führt möglicherweise zu einer Permeabilitätsveränderung der Membran und macht sie passierbar für Transmitter. Die Einzelschritte dieses Mechanismus sind noch unklar. Alle beschriebenen Hemmstoffe bewirken, als Konsequenz der ATPase-Hemmung, eine Änderung der intrazellulären Konzentration an Natrium, Kalium und Calcium. Die verminderte Aktivität der Na^+-K^+-Pumpe führt zu einer Na^+-Anreicherung, einem K^+-Verlust und einer gesteigerten intrazellulären Ca^{++}-Konzentration, zusammen mit einer Verminderung des Ruhepotentials. Bei der Depolarisation der Neurone kommt es zu entsprechenden Ionenveränderungen, die Ursache der erhöhten Transmitterausschüttung sein können. Bei jeder Depolarisation sind Calciumionen eine notwendige Voraussetzung für die Transmitterausschüttung (DOUGLAS, 1975).

Die Rolle der ATPase-Aktivität wird bevorzugt anhand experimenteller Bedingungen diskutiert, in denen Drogen die ATPase-Aktivität hemmen und so Transmitter freisetzen in Abwesenheit externer Calciumionen, da Calcium selbst ein Inhibitor der Na^+-K^+-aktivierbaren ATPase ist (SKOU, 1960; SOMOGYI & BUDAI, 1964).

Die von uns nachgewiesene Stimulierung des spontanen ^{3}H-5HT-Ausstroms durch THN ist deutlich Ca^{++}-abhängig. Im Gegensatz zu dem spontanen ^{3}H-5HT-Ausstrom ohne THN und ohne Calcium zeigt der spontane ^{3}H-5HT-Ausstrom in Gegenwart von THN aber ohne Calcium nur einen geringen Stimulationseffekt (s. Abb. 19a und b). Damit scheidet eine Hemmung der ATPase durch THN als alleiniger Schritt der Transmitterfreisetzung sicherlich aus. Inwieweit aber eine Hemmung der ATPase beteiligt ist, läßt sich noch nicht endgültig sagen. Von CANESSA und Mitarbeitern (1973) wurden die Harmaalkaloide als kompetitive Inhibitoren des Natriums im System der Na^+-K^+-aktivierbaren ATPase nachgewiesen. Den experimentellen Nachweis erbrachten Untersuchungen an Rattenhirnhomogenaten in einem Konzentrationsbereich von 0,3 bis 3 mmol/l. ISHIDA und Mitarbeiter (1981) untersuchten am Riesenaxon des Flußkrebses den Harmalineffekt in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 2,5 mmol/l. Zwar führte Harmalin in der höchsten Konzentration zu einer vollständigen Blockierung des Aktionspotentials, jedoch ohne eine Aktivitätsänderung der Na^+-K^+-aktivierbaren ATPase. Die Ca^{++}-Abhängigkeit des THN-Effekts könnte darauf beruhen, daß THN den modulierenden Einfluß auf die ^{3}H-5HT-Freisetzung über spezifische membran-gebundene Transportmechanismen entfaltet. Für diesen Wirkungsmechanismus spricht auch der schnelle Eintritt der THN-Wirkung.

Außerdem ist zu berücksichtigen, daß die Ausschüttung von ^{3}H-5-HT zumindest im Bereich höherer THN-Konzentrationen auch aus Gliazellen stammen könnte, da der Stimulationseffekt im Beobachtungszeitraum die Basiswerte nicht wieder erreicht. Dieser Kurvenverlauf entspricht nach VARGAS und Mitarbeitern (1977) dem Ausschüttungsmuster aus Gliazellen.

E IV. THN ALS MUTMASSLICHER TRANSMITTER

Nachdem der Nachweis erbracht war, daß THN eine zentral wirksame Substanz ist, stellt sich die Frage, ob THN selbst Eigenschaften eines Transmitters aufweist.

Zunächst wird in Vorversuchen die K^+-stimulierte ^{14}C-Ausschüttung in Abhängigkeit von der ^{14}C-THN-Konzentration im Inkubationsansatz sowie von der Inkubationszeit untersucht. Für alle weiteren Experimente wird die niedrigste THN-Konzentraion ($1{,}5 \times 10^{-4}$M) gewählt, die zu einem deutlich meßbaren Ergebnis führt bei möglichst kurzer Inkubationszeit (20 Min.). Mit diesen Versuchsbedingungen soll eine artefizielle Aufnahme der radioaktiv markierten Substanz in andere als Nervenzellen vermieden werden. Die aufgenommene Radioaktivität wird während der anschließenden Superfusion durch zweimalige K^+-Stimulation von jeweils 5 Minuten Dauer spezifisch ausgeschüttet (Abb. 20 und 21). Dabei muß im Falle des Ausstroms von exogen zugeführten Substanzen aus ZNS-Gewebeschnitten besonders beachtet werden, daß der durch Depolarisation induzierte Ausstrom nicht ein unspezifisches Phänomen ist. Der Kurvenverlauf erreicht ein Maximum 4 - 6 Minuten nach Beginn der Stimulation und kehrt nach weiteren 6 Minuten zur Basislinie zurück. Dieses Stimulationsmuster entspricht damit nicht dem bereits beschriebenen aus Gliazellen (VARGAS et al., 1977). Die zweite Stimulationsperiode führt in der Regel zu einem schwächeren Effekt als die erste, was möglicherweise mit der Begrenztheit des Transmitterpools für eine schnelle Umsatzrate zusammenhängt (BELLEROCHE et al., 1976). Der spontane Ausstrom der Radioaktivität erfolgt unabhängig von hohen K^+-Konzentrationen aufgrund anderer Lokalisation und Freisetzungsmechanismen (siehe Seite 145).

Ein Effekt auf den spontanen Ausstrom durch MAO-Hemmung ist unwahrscheinlich. In verschiedenen Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß THN auf MAO inhibierend wirkt, allerdings liegt die IC_{50} dafür wesentlich höher als die eingesetzten THN-Konzentrationen (BUCKHOLTZ & BOGGAN, 1977 b; BUCKHOLTZ & BOGGAN, 1976). Daß die ausgeschüttete Radioaktivität auch tatsächlich ^{14}C-THN entspricht, wurde in Experimenten von ROMMELSPACHER und SUBRAMANIAN (1979) unter entsprechenden Bedingungen bereits nachgewiesen. Dazu wurde der Superfusionspuffer vor, während und nach der K^+-Stimulation gesammelt und radiochromatographiert. Dabei wurde nur ein einmaliger Anstieg der Meßkurve nachgewiesen, die authentischem THN (UV-Nachweis) entsprach mit einem R_f-Wert von 0,53.

Mit den folgenden Experimenten wurde die Frage untersucht, ob THN in Abhängigkeit von der Ca^{++}-Konzentration ausgeschüttet wird. Bei der Depolarisation gilt der gleichzeitige Einstrom der Calciumionen als wesentlicher Mechanismus für die Stimulus-gebundene Ausschüttung zentraler Transmitter (BLAUSTEIN et al., 1972; BLAUSTEIN, 1975). Dabei wird der Calciumeinstrom in einem komplexen Mechanismus durch die intra- und extrazelluläre Konzentration von Natrium und Kalium reguliert (BLAUSTEIN & OBORN, 1975).

Die Ca^{++}-Abhängigkeit der THN-Ausschüttung untersuchten wir in einem Konzentrationsbereich von 0 - 2,54 mM Ca^{++}. Dabei zeigt sich, daß die Anwesenheit von Calciumionen eine notwendige Voraussetzung für die K^+-induzierte ^{14}C-THN-Ausschüttung ist und daß dabei eine Konzentrationsabhängigkeit besteht. Die Höhe der Ca^{++}-Konzentration, die zu einer deutlich meßbaren Ausschüttung führt, scheint Substanz-spezifisch zu sein. So ist die Ca^{++}-Konzentration, mit der eine spezifische DA-Ausschüttung ausgelöst werden kann, niedriger als die, die

für eine spezifische NA-Ausschüttung benötigt wird (GARCIA et al., 1975; THOA et al., 1974). Wir erzielten mit 2,54 mM Ca^{++} einen deutlich meßbaren Effekt.

In Abbildung 22e ist die Ca^{++}-Abhängigkeit der THN-Ausschüttung dargestellt. Bei den Versuchen war Calcium im Inkubationsmedium anwesend, während die anschließende Superfusion mit Ca^{++}-freiem Superfusionsmedium durchgeführt wurde. Diese Zeitspanne ist offensichtlich unzureichend, da noch eine geringe K^{+}-induzierte Ausschüttung unter diesen Bedingungen nachweisbar ist. Für den Ausschüttungsprozeß genügen offensichtlich geringe Mengen Calcium, die in intra- oder extrazellulär gebundener Form genutzt werden. Diesen Schluß ziehen auch SEGAWA und Mitarbeiter (1978b) aus ähnlichen Experimenten.

Die Calcium-Abhängigkeit der Transmitterausschüttung wurde mit der 'Calcium-Hypothese' zunächst von KATZ und MILEDI (1970) aufgestellt. Nach ihrer Hypothese reicht allein die ansteigende intrazelluläre Konzentration an freiem Calcium aus, um die spezifische Transmitterausschüttung auszulösen. Die verbindenden Schritte zwischen erhöhter Ca^{++}-Konzentration und spezifischer Ausschüttung sind noch nicht vollständig geklärt. Die Hypothesen darüber sind noch divergierend. BERL und Mitarbeiter (1973) diskutieren eine chemomechanische Interaktion mit Neurofilamenten als Vermittler des exocytotischen Prozesses. VIZI (1978) sieht dagegen in der Hemmung der membrangebundenen ATPase als Folge des Ca^{++}-Einstroms den auslösenden Mechanismus für die Transmitterfreisetzung. Hinweise darauf, daß zumindest ein exocytotischer Prozeß zugrundeliegt, geben:

1.) elektronenmikroskopischer Nachweis vesikulärer Strukturen in Kontakt mit der Plasmamembran (FRIED & BLAUSTEIN, 1976)

2.) Ca^{++}-abhängige und Depolarisations-induzierte Ausschüttung eines nicht-metabolisierten Transmitters (RAITERI et al., 1975)

3.) gleichzeitige Stimulations-induzierte Ausschüttung anderer nachweislich vesikulär-gebundener Substanzen wie z.B. Proteine und Adeninnucleotide (ORREGO, 1979).

Die ^{14}C-THN-Ausschüttung weist mit der K^+-Stimulierbarkeit und der Ca^{++}-Abhängigkeit dieses Prozesses Eigenschaften auf, wie sie für die spezifische Ausschüttung einer Transmittersubstanz gefordert werden. MULDER und SNYDER (1974) bestätigen die induzierte Freisetzung als Kriterium für einen fraglichen Neurotransmitter. In diesen Studien zeigt sich eine selektive Ausschüttung durch K^+-Depolarisation bei einer strengen Ca^{++}-Abhängigkeit. Danach stellt sich die Frage, aus welchem zellulären Kompartiment die ausgeschüttete Radioaktivität stammt. Mit der Reserpin-Vorbehandlung wird untersucht, ob THN nach vesikulärer Speicherung freigesetzt wird. Wie bereits an der ^{3}H-5HT-Ausschüttung nach Reserpin-Vorbehandlung dargestellt wurde, (s. Seite 134f) blockiert Reserpin die Monoamin-Aufnahme und -Speicherung in synaptischen Vesikeln, ohne die Membran-Carrier zu beeinflussen (SLOTKIN, 1974). Wie Abbildung 23 zeigt, wird durch Reserpin der Anteil der K^+-induzierten THN-Ausschüttung ebenfalls deutlich vermindert. Nach Reserpin-Vorbehandlung in vivo wird THN wahrscheinlich im extravesikulären Kompartiment gespeichert, von wo es durch Membrandepolarisation kaum freisetzbar ist. Da der spontane Ausstrom nicht wesentlich erhöht ist, kann man vermuten, daß die Zahl der cytoplasmatischen Bindungsstellen hoch ist. JONAKAIT und Mitarbeiter (1977) weisen in serotonergen Neuronen des ZNS ein lösliches Serotonin-bindendes Protein nach. Eine Funktion dieses Proteins könnte die nicht-partikuläre Speicherung von Serotonin sein. Reserpin-Vorbehandlung führt in diesen Experimenten zu einer gesteigerten Serotonin-Bindungskapazität. Die Zunahme der verfügbaren Bindungsstellen ist Folge einer Abnahme an endogenem Serotonin. Reserpin steigert den spontanen NA-Ausstrom wesentlich stärker als den von DA und 5-HT. Dieses Ergebnis läßt sich damit erklä-

ren, daß die extravesikalen Bindungsstellen in noradrenergen Neuronen nicht so zahlreich sind wie in dopaminergen und serotonergen Neuronen (ROSS, 1979). Aufgrund dieser Überlegungen müßte man erwarten, daß in unseren Experimenten die in den Gewebeschnitten im Anschluß an die Superfusion gemessene Radioaktivität erhöht ist. Dieser Anstieg liegt jedoch innerhalb der üblichen Schwankungsbreite der Radioaktivität in den Gewebeschnitten, so daß er sich nicht eindeutig interpretieren läßt.

Anhand dieser Experimente und bereits veröffentlichter Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe lassen sich einige Kriterien, die für THN als mutmaßlichen Transmitter sprechen, aufstellen. In Anlehnung an ORREGO (1979) werden dabei primäre und sekundäre Kriterien unterschieden. Zu den primären gehören:

1.) induzierte Freisetzung: THN wird in Hypothalamusschnitte der Ratte aufgenommen. Anschließende Stimulation durch einen quasi physiologischen Reiz (31 mM K^+) führt zur spezifischen Ausschüttung der Substanz in das Superfusionsmedium. Diese Ausschüttung zeigt eine echte Abhängigkeit von der extrazellulären Calciumkonzentration.
2.) Identität der Wirkung: THN sollte nach extrazellulärer Applikation an der Postsynapse zu den gleichen Effekten führen wie der natürliche Transmitter. In verschiedenen pharmakologischen Tests löst systemische Anwendung von THN Effekte bei Ratten und Mäusen aus. Diese erinnern, wie beispielsweise im Hyperaktivitätstest, an die durch L-5-Hydroxytryptophan hervorgerufenen Effekte (ROMMELSPACHER et al., 1977).
3.) Lokalisation in den synaptischen Vesikeln: Einen Hinweis darauf gibt die Reserpin-Vorbehandlung, die die K^+-induzierte THN-Ausschüttung verhindert.

Zu den sekundären Kriterien gehören:

1.) Die postsynaptische Wirkung des mutmaßlichen Transmitters sollte durch Drogen beeinflußbar sein: Apomorphin antagonisiert die THN-Wirkung (PANNIER & ROMMELSPACHER, 1981).

2.) Das Enzym zur Synthese und die Vorstufen des Transmitters sollten im präsynaptischen Neuron zur Verfügung stehen: THN entsteht durch Kondensation von Tryptamin und Formaldehyd. Sowohl die Vorstufen dieser Reaktion als auch die beteiligten Enzyme konnten in vivo nachgewiesen werden (PEARSON & TURNER, 1979).

3.) Verschiedene ZNS-Regionen sollten den Transmitter in unterschiedlicher Konzentration enthalten: THN kommt im Gehirn der Ratte sowie in den Thrombozyten und im Urin von Ratte und Mensch vor. Die THN-Konzentration im Rattenhirn steigt in Abhängigkeit von der Höhe der Tryptamin-Vorbehandlung (HONECKER & ROMMELSPACHER, 1978).

Diese Aufstellung wird von uns durch das folgende Kriterium ergänzt:

4.) THN wird in vivo metabolisiert: THN wird zunächst hydroxyliert und anschließend durch Konjugation mit Glucuronsäure inaktiviert. Damit ist möglicherweise ein spezifischer Abbauweg der Indolalkylamine neben der Oxidation durch MAO nachgewiesen (ROMMELSPACHER & GREINER, 1978).

Trotz dieser aufgeführten Charakteristika eines Transmitters bedarf die Rolle des THN bei der Erregungsübertragung einer kritischen Überprüfung. Die gegenwärtigen Konzepte der Erregungsübertragung scheinen nur eine binär codierte Information (Erregung oder Hemmung) zu benötigen, evtl. noch in Verbindung mit einem Zeitfaktor. Bei der Entschlüsselung der Information spielt der postsynaptische Rezeptor eine entscheidende Rolle. Inwieweit dafür eine Vielzahl unterschiedlicher Transmitter notwendig ist, stellt ANDERSON (1980) in Frage.

E V. THN ALS 'COTRANSMITTER' ODER 'FALSCHER TRANSMITTER'

Die Ergebnisse unserer Doppelmarkierungsexperimente liefern Hinweise dafür, inwieweit die THN-Wirkung dem Konzept des 'falschen' - bzw. 'Cotransmitters' entspricht. Nach gleichzeitiger Inkubation mit ^{3}H-5-HT und ^{14}C-THN zeigt sich die gegenseitige Beeinflussung im Ausstrom der Radioaktivität. Eine ansteigende THN-Konzentration im Inkubationsansatz führt während der anschließenden K^{+}-Stimulation zum erhöhten Ausstrom beider Substanzen. Umgekehrt führt eine ansteigende 5-HT-Konzentration bei konstanter THN-Konzentration zu einem entsprechenden Effekt.

Demnach stimuliert THN die Freisetzung von ^{3}H-5-HT aus Gewebeschnitten des Hypothalamus der Ratte sowohl nach K^{+}-Stimulation als auch, wie weiter oben diskutiert, ohne K^{+}-Stimulation. Umgekehrt gilt, daß 5-HT die Freisetzung von THN stimuliert. Beide Substanzen koexistieren höchstwahrscheinlich in Vesikeln, da ihre Freisetzung Ca^{++}-abhängig ist und durch Vorbehandlung mit Reserpin verhindert werden kann.

Auch für andere biologisch aktive Substanzen wurde der Nachweis erbracht, daß sie mit dem Transmitter im gleichen Vesikel koexistieren. Diese Substanzen sind per Definition Cotransmitter, da sie gemeinsam mit dem Transmitter durch die gleichen Mechanismen ausgeschüttet werden. Außerdem haben sie bestimmte Effekte am postsynaptischen Rezeptor, die gewöhnlich schwächer sind als die des Transmitters. Schließlich liegen sie im Vesikel in geringerer Konzentration vor als der Transmitter. Beispiele für diesen Transmittertyp könnten Substanz P, Octopamin, Glutamat, Glutamin und andere Amine sein (BORYS et al., 1973; BROWNSTEIN et al., 1974; CHAN-PALAY et al., 1978).

Dabei ist es gleichgültig, ob die 'Cotransmitter' im Neuron synthetisiert werden durch Abbau entstehen (DALE, 1955) oder über weniger spezifische Transportsysteme dorthin aufgenommen werden (COTTREL, 1976; ETCHEVERRY & ZIEHER, 1968; KERKUT et al., 1967; MATTHAEI et al., 1976; SLOTKIN et al., 1978).

Von OSBORNE (1977) wird die Hypothese der Koexistenz von mehr als einem Transmitter in nur einem Vesikel einer kritischen Prüfung unterzogen. Er weist die alleinige Anwesenheit von 5-HT in Neuronen von Gastropoden nach und kehrt damit zur Hypothese von DALE zurück: daß jedes Neuron nur einen Transmitter enthält und ausschüttet. Die widersprechenden Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen führt er auf methodisch bedingte Verunreinigungen aus Gliazellen und anderen kleinen Neuronen der Umgebung zurück. Allerdings schließt er die Anwesenheit weiterer endogener Substanzen in geringen Mengen nicht aus, da unter dem Gesichtspunkt der Evolution anzunehmen ist, daß alle Neurone die gleiche genetische Ausrüstung besitzen. Die physiologische Bedeutung solcher Substanzen bleibt Gegenstand weiterer Forschung.

Die Hypothese, daß THN als 'Cotransmitter' in Vesikeln vorkommt, die 5-HT als Transmitter enthalten, erscheint wenig wahrscheinlich, da THN nicht nur abgeschwächte serotonerge Wirkungen entfaltet sondern auch antidopaminerge (ROMMELSPACHER et al., 1977). Wie unsere Experimente gezeigt haben, hängt der 5-HT-Betrag, der während einer Depolarisation freigesetzt wird, von der THN-Konzentration ab. Während niedrige THN-Konzentrationen die 5-HT-Ausschüttung hemmen, führen hohe THN-Konzentrationen zu einer gesteigerten 5-HT-Ausschüttung, damit verstärkt THN die 5-HT-Wirkung an der Postsynapse.

Offensichtlich sind die Vesikel nicht vollständig mit 5-HT aufgefüllt. Darauf lassen auch die Experimente von BAKER und Mitarbeitern (1980) schließen. Sie erreichten nach Beladung mit der Vorstufe Tryptophan und gleichzeitiger MAO-Hemmung eine erhöhte 5-HT-Ausschüttung. Aufgrund dieser Beobachtungen ist es vorstellbar, daß die Vesikel unterschiedliche Mengen an THN enthalten. Wie diese THN-Konzentration reguliert wird, bedarf noch weiterer Klärung.

Unabhängig davon belegen die Experimente, daß auf die Zugabe von THN im Inkubationsansatz und im Superfusionsmedium ein Konzentrationsanstieg von 5-HT folgt. Dieses Ergebnis schließt eine mögliche Wirkungsweise des THN als 'falscher' Transmitter aus. 'Falsche' Transmitter, wie beispielsweise Phenyläthylamin, haben die Fähigkeit nach exogener Zufuhr den Transmitter aus den Speichervesikeln zu verdrängen. Eine anschließende Stimulation der Neurone führt zur Ausschüttung dieser Substanzen an Stelle des Transmitters (BALDESSARINI, 1971; FISCHER et al., 1965; KOPIN, 1968; MUSACCHIO et al., 1966).

Die Bedeutung von THN ist am ehesten in der eines Neuromodulators zu sehen. Der modulierende Effekt geschieht über eine Wirkungsverstärkung des 5-HT. Diese Auffassung unterstützen auch die von uns durchgeführten pharmakologischen Experimente. Die Rolle des Neuromodulators führt zu einer dynamischen Betrachtungsweise der Transmittereffekte, das heißt: der Einfluß einer sogenannten 'endokrinen Umgebung', wie sie durch die Wirkung von Neuromodulatoren geschaffen wird, bestimmt die Transmitterwirkung mit (ROTSZTEJN, 1980). Damit ließe sich auch erklären, daß der gleiche Neurotransmitter in unterschiedlichen Gewebestrukturen verschiedene, zum Teil auch widersprüchliche, Wirkungen entfalten kann.

Die klinische Relevanz unserer Ergebnisse liegt darin, daß THN ähnliche Effekte zeigt wie die Antidepressiva. Dies geschieht, indem THN die 5-HT-Wirkung im Bereich der Synapse fördert. Daran sind mehrere Mechanismen beteiligt:

1.) Stimulation der spezifischen Ausschüttung

2.) Hemmung der spezifischen Wiederaufnahme (ROMMELSPACHER et al., 1976 und 1978b).

3.) MAO-Hemmung (BUCKHOLTZ & BOGGAN, 1976 und 1977 a)

Im Zusammenhang mit neurochemischen Prozessen bei der Depression hat 5-HT als Überträgersubstanz eine herausragende Bedeutung (MATUSSEK, 1969 und 1972). Wie unsere Versuche gezeigt haben, hemmen niedrige THN-Konzentrationen (10^{-7}mol/l) die 5-HT-Ausschüttung. Dieser Befund läßt sich damit erklären, daß THN über die präsynaptischen Rezeptoren serotonerger Neurone inhibitorisch auf die Ausschüttung wirkt. Unter diesem Aspekt ist THN den trizyklischen Antidepressiva ähnlich. Der psychopathologische Stellenwert dieser Ergebnisse muß noch offenbleiben. Nach van PRAAG (1977) lassen sich durch eine Aktivierung einzelner Neuronentypen noch keine Veränderungen der Psychopathologie in eine bestimmte Richtung erwarten. Generell ist es problematisch, aus tierexperimentellen Arbeiten Schlüsse zu ziehen, die einzelne Neuronensysteme mit psychopathologischen Verhaltensweisen verknüpfen.

F. TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

In Tabelle 6a sind die untersuchten Einflüsse auf die ^{3}H-5HT-Freisetzung zusammengefaßt.

Der spontane ^{3}H-Ausstrom wird durch die Reserpin-Vorbehandlung nicht beeinflußt und durch THN im Superfusionsmedium erhöht. Dieser THN-Effekt ist Calcium-abhängig.

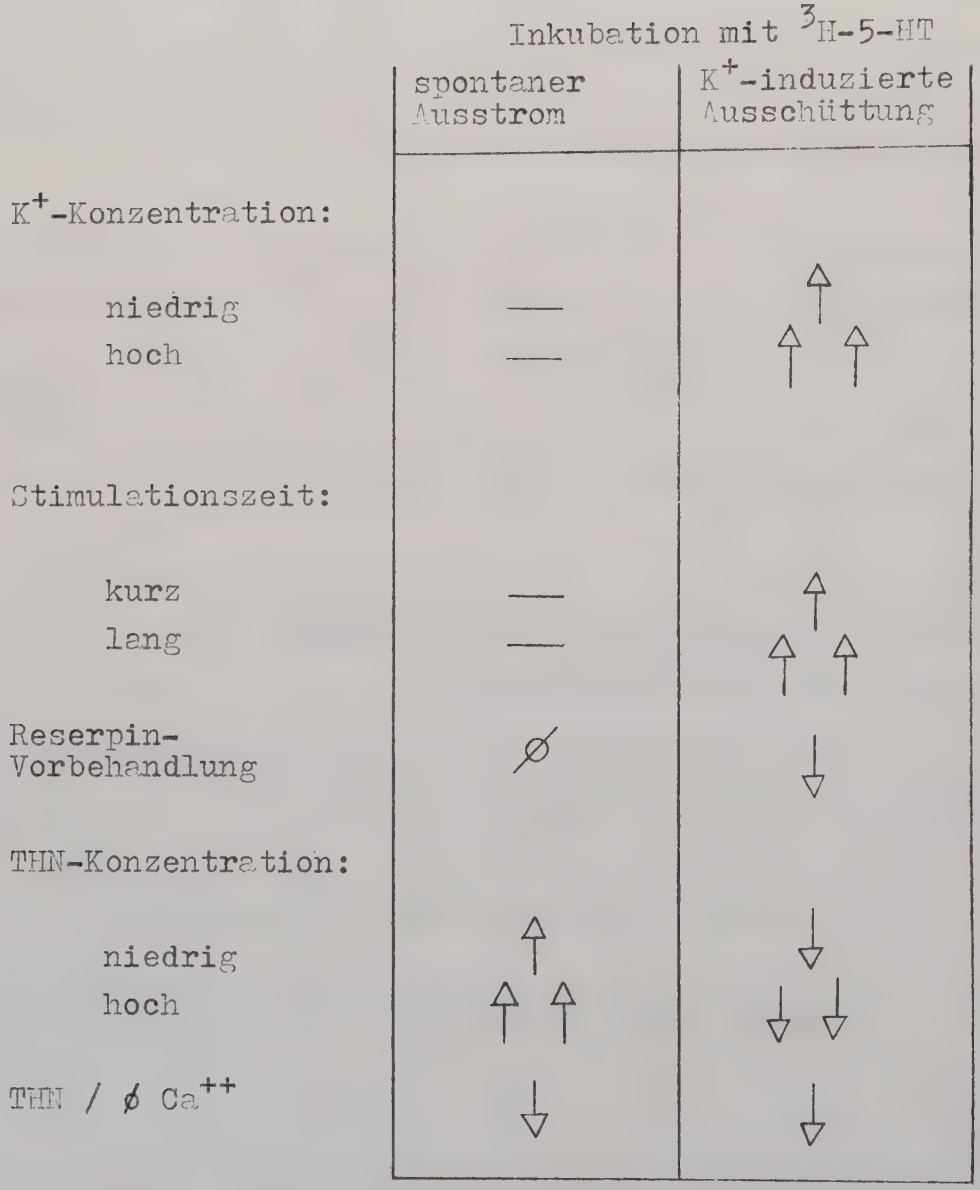
Die K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung wird durch ansteigende K^{+}-Konzentration und in Abhängigkeit von der Stimulationszeit zunehmend erhöht, Reserpin-Vorbehandlung verhindert die K^{+}-induzierte ^{3}H-Ausschüttung. Sie wird durch THN im Superfusionsmedium dosisabhängig zunächst erniedrigt und dann stark erhöht. Auch dieser Effekt ist Calcium-abhängig.

Tab. 6a-c: Tabellarische Zusammenfassung der Versuchsergebnisse

Ø kein meßbarer Einfluß auf die Freisetzung der Radioaktivität

↑ erhöhte Freisetzung der Radioaktivität

↓ verminderte Freisetzung der Radioaktivität


Inkubation mit ^{3}H-5-HT
spontaner Ausstrom
K^{+}-induzierte Ausschüttung
K^{+}-Konzentration:
niedrig
hoch
Stimulationszeit:
kurz
lang
Reserpin-Vorbehandlung
THN-Konzentration:
niedrig
hoch
THN / ∅ Ca^{++}

Tab. 6a

In Tabelle 6b sind die Bedingungen aufgeführt, unter denen ^{14}C-THN selbst im Anschluß an die Inkubation freigesetzt wird.

Der spontane ^{14}C-Ausstrom wird durch die jeweils veränderten Versuchsbedingungen nicht beeinflußt.

Die K^+-induzierte ^{14}C-Ausschüttung wird durch ansteigende THN-Konzentrationen im Inkubationsmedium sowie in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zunehmend erhöht. Dieser Effekt ist abhängig von der Ca^{++}-Konzentration. Reserpin-Vorbehandlung verhindert die K^+-induzierte ^{14}C-Ausschüttung.

Inkubation mit ^{14}C-THN

	spontaner Ausstrom	K^+-induzierte Ausschüttung
THN-Konzentration: (im Inkubationsansatz)		
niedrig	⌀	↑
hoch	⌀	↑
Inkubationszeit:		
kurz	⌀	↑
lang	⌀	↑
Ca^{++}-Konzentration:		
⌀	⌀	↓
niedrig	⌀	↑
hoch	⌀	↑
Reserpin-Vorbehandlung	⌀	↓

Tab. 6b

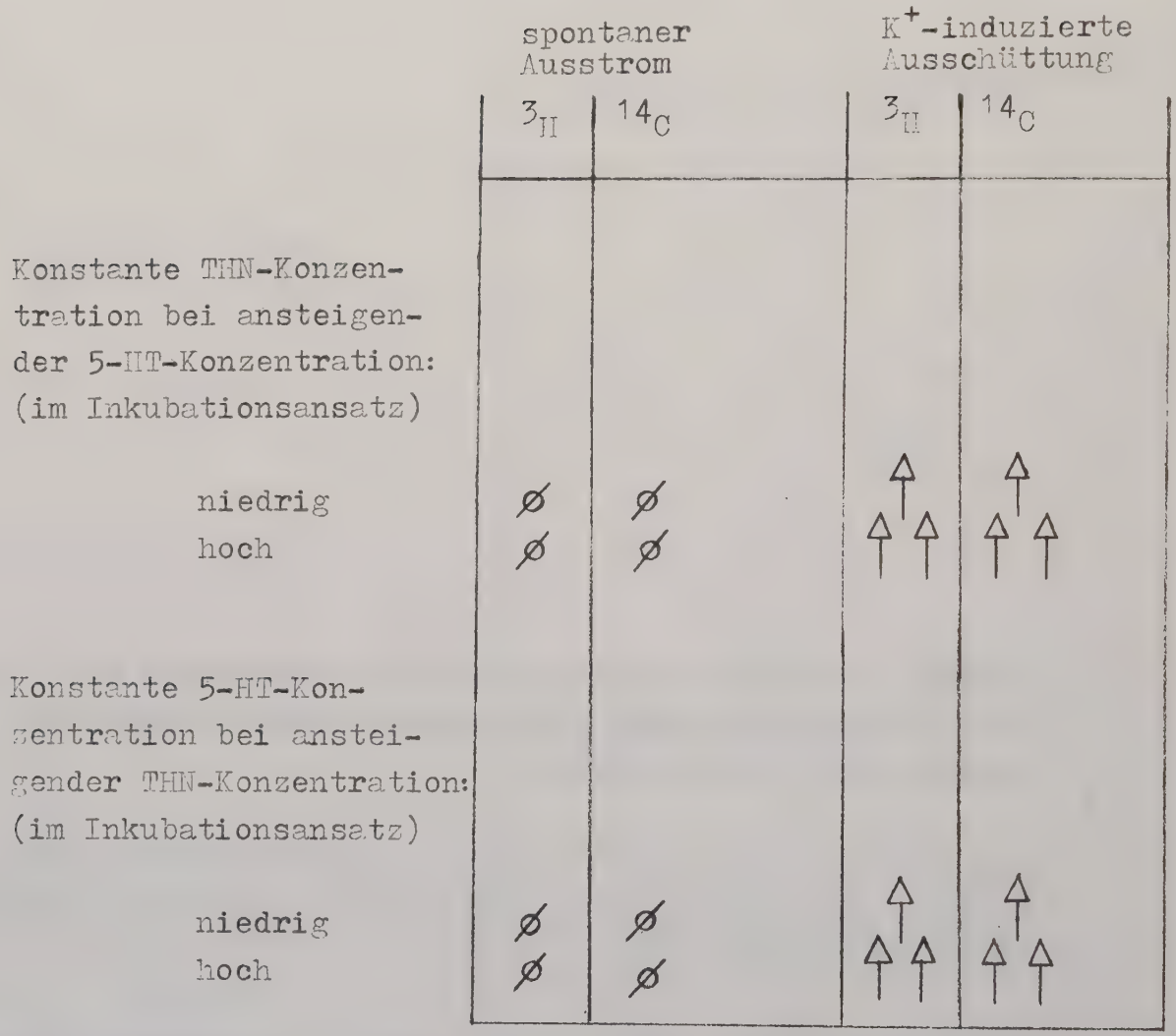
Tabelle 6c zeigt nach gleichzeitiger Inkubation mit ^{3}H-5-HT und ^{14}C-THN die gegenseitige Beeinflussung während der Freisetzung der Radioaktivität.

Der spontane ^{14}C- und ^{3}H-Ausstrom wird von den variierten ^{3}H-5HT- und ^{14}C-THN-Konzentrationen im Inkubationsmedium nicht beeinflußt.

Die K^{+}-induzierte Ausschüttung beider Substanzen wird durch konstante 5-HT- und ansteigende THN-Konzentrationen im Inkubationsmedium erhöht. Umgekehrt führten konstante THN- und ansteigende 5-HT-Konzentrationen ebenfalls zur erhöhten K^{+}-induzierten Ausschüttung beider Substanzen.

Anhand dieser Ergebnisse wurde die Rolle des THN als Neuromodulator in serotonergen Neuronen diskutiert. THN weist gleichzeitig Eigenschaften auf, wie sie für einen mutmaßlichen Neurotransmitter gefordert werden. Es bedarf noch einer weiteren Prüfung dieser Substanz, um ihre endgültige Rolle bei der zentralen Erregungsübertragung zu definieren.

Inkubation mit ^{3}H-5-HT und ^{14}C-THN



Tab. 6c

G. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1) ADLER-GRASCHINSKY, E. & LANGER, S.Z.
Possible role of a ß-adrenoceptor in the regulation of nordadrenaline release by nerve stimulation through a positive feed-back mechanism.
Brit. J. Pharmac. 53 (1975) 43-50

2) AGRANOFF, B.W.
Neurotransmitters and synaptic transmission.
Fed. Proc. 34 (1975) 1911-1914

3) ANDÉN, N.-E.; DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K.; LARSSON, K.; OLSON, L. & UNGERSTEDT, U.
Ascending monoamine neurons to the telencephalon and diencephalon.
Acta Physiol. Scand. 67 (1966) 313-326

4) ANDERSON, E.G.
Are there too many neurotransmitters?
Trends Pharmacol. 1 (1980) 246-247

5) ANDREWS, D.W.; PATRICK, R.L. & BARCHAS, J.D.
The effects of 5-hydroxytryptophan and 5-hydroxytryptamine on dopamine synthesis and release in rat brain striatal synaptosomes.
J.Neurochem. 30 (1978) 465-470

6) AZZARO, A.J. & RUTLEDGE, C.O.
Selectivity of release of norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine by amphetamine in various regions of rat brain.
Biochem. Pharmacol. 22 (1973) 2801-2813

7) BAKER, G.B.; HIOB, L.E. & DEWHURST, W.G.
Effects of monoamine oxidase inhibitors on release of dopamine and 5-hydroxytryptamine from rat striatum in vitro.
Cell. Mol. Biol. 26 (1980) 183-186

8) BALDESSARINI, R.J.
Release of aromatic amines from brain tissues of the rat in vitro.
J. Neurochem. 18 (1971) 2509-2518

9) BANERJEE, S.P. & SNYDER, S.H.
Methyltetrahydrofolic acid mediates N- and O-methylation of biogenic amines.
Science 182 (1973) 74-75

10) BARCHAS, J.D.; ELLIOT, G.R.; DoAMARAL, J.; ERDELYI, E.; O'CONNOR, S.; BOWDEN, M.; BRODIE, H.K.H.; BERGER, P.A.; RENSON, J. & WYATT, R.J.
Triptolines, formation from tryptamines and 5-MTHF by human platelets.
Arch. Gen. Psychiat. 31 (1974) 862-867

11) BARKER, S.A.; HARRISON, R.E.; BROWN, G.B. & CHRISTIAN, S.T.
Gas chromatographic/mass spectrometric evidence for the identification of 1,2,3,4-tetrahydro-ß-carboline as an in vivo constituent of rat brain.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 87 (1979) 146-154

12) BELLEROCHE, de J.S. & BRADFORD, H.F.
Amino acids in synaptic vesicles from mammalian cerebral cortex: a reappraisal
J. Neurochem. 21 (1973a) 441-451

13) BELLEROCHE, de J.S. & BRADFORD, H.F.
The synaptosome: an isolated, working, neuronal compartment.
Prog. Neurobiol. 1 (1973b) 275-298

14) BELLEROCHE, de J.S.; BRADFORD, H.F. & JONES, D.G.
A study of the metabolim and release of dopamine and amino acids from nerve endings isolated from sheep corpus striatum.
J. Neurochem. 26 (1976) 561-571

15) BENNET, J.P.; MULDER, A.H. & SNYDER, S.H.
Neurochemical correlates of synaptically active amino acids.
Life Sci. 15 (1974) 1045-1056

16) BERL, S.; PUSZKIN, S. & NICKLAS, W.J.
Actomyosin-like protein in brain.
Science 179 (1973) 441-446

17) BIRKS, R.I.
The relationship of transmitter release and storage to fine structure in a sympathetic ganglion.
J. Neurocytol. 3 (1974) 133-160

18) BJÖRKLUND, A.; FALCK, B.; LINDVALL, O. & SVENSSON, L.A.
New aspects on reaction mechanisms in the formaldehyde histofluorescence method for monoamines.
J. Histochem. Cytochem. 21 (1973) 17-25

19) BLAUSTEIN, M.P.
Effects of potassium, veratridine and scorpion venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminals in vitro.
J. Physiol. 247 (1975) 617-655

20) BLAUSTEIN, M.P.; JOHNSON, E.M. & NEEDLEMAN, P.
Calcium-dependent norepinephrine release from presynaptic nerve endings in vitro.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 (1972) 2237-2240

21) BLAUSTEIN, M.P. & OBORN, C.J.
The influence of sodium on calcium fluxes in pinched off nerve terminals in vitro.
J.Physiol. 247 (1975) 657-686

22) BLAUSTEIN, M.P. & WIESMANN, W.P.
Potassium ions and calcium ion fluxes in isolated nerve terminals.
in: Drugs and cholinergic mechanisms in the CNS; Proceedings (edt. E. HEILBRONN & A. WINTER)
Stockholm (1970) 291-307

23) BOGDANSKI, D.F.
Mechanisms of transport for the uptake and release of biogenic amines in nerve endings. Transport phenomena in the nervous system. Physiological and pathological aspects.
Adv. Exp. Med. Biol. 69 (1976) 291-303

24) BORYS, H.K.; WEINREICH, D. & McCAMAN, R.E.
Determination of glutamate and glutamine in individual neurons of Aplysia californica.
J. Neurochem. 21 (1973) 1349-1351

25) BOURGOIN, S.; ARTAUD, F.; ENJALBERT, A.; HÉRY, F.; GLOWINSKI, J. & HAMON, M.
Acute changes in central serotonin metabolism induced by the blockade or stimulation of serotonergic receptors during ontogenesis in the rat.
J.Pharm. Exp. Ther. 202 (1977) 519-531

26) BRADFORD, H.F.
Membrane potentials and metabolic performance in mammalian synaptosomes.
in: Cellular organelles and membranes in mental retardation.
(edt. P.F. BENSON) Churchill, London (1971) 1-15

27) BROWNSTEIN, M.J.; SAAVEDRA, J.M.; AXELROD, J.; ZEMAN, G.H. & CARPENTER, D.O.
Coexistence of several putative neurotransmitters in single identified neurons of Aplysia.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71 (1974) 4662-4665

28) BUCKHOLTZ, N.S. & BOGGAN, W.O.
Effects of tetrahydro-ß-carbolines on monoamine oxidase and serotonin uptake in mouse brain.
Biochem. Pharmacol. 25 (1976) 2319-2321

29) BUCKHOLTZ, N.S. & BOGGAN, W.O.
Inhibition by ß-carbolines of monoamine uptake into a synaptosomal preparation: Strukture-activity relationships.
Life Sci. 20 (1977a) 2093-2100

30) BUCKHOLTZ, N.S. & BOGGAN, W.O.
Monoamine oxidase inhibition in brain and liver produced by ß-carbolines: structure-activity relationships and substrate specificity.
Biochem. Pharmacol. 26 (1977b) 1991-1996

31) BURKARD, W.P. & KETTLER, R.
Harmaline and its sulfur analogue: increase of cerebellar cyclic GMP and inhibition of monoamine oxidase.
Biochem. Pharmacol. 26 (1977) 1303-1306

32) CANESSA, M.; JAIMOVICH, E. & FUENTE, de la M.
Harmaline: a competitive inhibitor of Na ion in the (Na^+ + K^+)-ATPase system.
J. Membr. Biol. 13 (1973) 263-282

33) CANTONI, G.L.
Biological methylation: selected aspects.
Ann. Rev. Biochem. 44 (1975) 435-451

34) CARLSSON, A.
Pharmacological depletion of catecholamine stores. Modification of symathetic function.
Pharmacol. Rev. 18 (1966) 541-549

35) CARMICHAEL, F.J. & ISRAEL, Y.
Effects of ethanol on neurotransmitter release by rat brain cortical slices.
J. Pharmac. Exp. Ther. 193 (1975) 824-834

36) CHAN-PALAY, V.; JONSSON, G. & PALAY, S.L.
Serotonin and substance P coexist in neurons of the rat's central nervous system.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 1582-1586

37) CHASE, T.N.; KATZ, R.I. & KOPIN, I.J.
Release of (^{3}H)serotonin from brain slices.
J. Neurochem. 16 (1969) 607-615

38) COLBURN, R.W. & KOPIN, I.J.
Effects of reserpine and tyramine on release of norepinephrine from synaptosomes.
Biochem. Pharmacol. 21 (1972) 733-736

39) COTTRELL, G.A.
Does the giant cerebral neurone of Helix release two transmitters: ACh and serotonin?
J. Physiol. (London) 259 (1976) 44P-45P

40) CROW, T.J.; DEAKIN, J.F.W.; JOHNSTONE, E.C. & LONGDEN, A.
Dopamine and schizophrenia.
Lancet II (1976) 563-566

41) DALE, H.H.
Junctional transmission of nervous effects by chemical agents.
Proc. Staff Meet. Mayo Clin. 30 (1955) 5-20

42) DAVIS, V.E.
Neuroamine-derived alkaloids: a possible common denominator in alcoholism and related drug dependencies.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 215 (1973) 111-115

43) DIEZ, J.A.; WARD, W.G. & SUMMER, G.K.
Tryptophan transport in brain synaptosomes: effects of L-DOPA.
Brain Res. 117 (1976) 534-539

44) DISMUKES, K.; BOER, de A.A. & MULDER, A.H.
On the mechanism of alpha-receptor mediated modulation of ^{3}H-noradrenaline release from slices of rat brain neocortex.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 299 (1977) 115-122

45) DOUGLAS, W.W.
Stimulus-secretion coupling in mast cells: regulation of exocytosis by cellular and extracellular calcium.
in: Calcium transport in contraction and secretion (edt. E. CARAFOLI)
North-Holland, Amsterdam (1975) 167-174

46) DUNANT, Y. & ISRAËL, M.
When the vesicular hypothesis is no longer the vesicular hypothesis.
Trends Neurosci. 2 (1979) 130-132

47) ETCHEVERRY, G.J. & ZIEHER, L.M.
Cytochemistry of 5-hydroxytryptamine at the electron microscope level.II.Localization in the autonomic nerves of the rat pineal gland.
Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 86 (1968) 393-400

48) FALCK, B.
Observations on the possibilities of the cellular localisation of monoamines by a fluorescence method.
Acta Physiol. Scand. 56 Suppl.197 (1962) 1-25

49) FALCK, B.; HILLARP, N.-Å.; THIEME, G. & TORP, A.
Fluorescence of catechol amines and related compounds condensed with formaldehyde.
J. Histochem. Cytochem. 10 (1962) 348-354

50) FISCHER, J.E.; HORST, W.D. & KOPIN, I.J.
ß-hydroxylated sympathomimetic amines as false neurotransmitters.
Brit. J. Pharmac. 24 (1965) 477-484

51) FLOREY, E.
Physiological evidence for naturally occurring inhibitory substances.
in: Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid.
(edtl. E. ROBERTS)
Pergamon Press, Oxford (1960) 72-84

52) FOZARD, J.R.
Blockade of receptors for 5-hydroxytryptamine on the sympathetic nerves of the rabbit heart.
in: Advances in the biosciences.
(edt. S.Z. LANGER; K. STARKE & M.L. DUBOCOVICH)
Pergamon Press, Oxford 18 (1979) 327-332

53) FRIED, R.C. & BLAUSTEIN, M.P.
Synaptic vesicle recycling in synaptosomes in vitro.
Nature 261 (1976) 255-256

54) FRIEDHOFF, A.J. & WINKLE, van E.
Isolation and characterization of a compound from the urine of schizophrenics.
Nature 194 (1962) 897-898

55) FUXE, K.; HÖKFELT, T.; JONSSON, G. & UNGERSTEDT, U.
Fluorescence microscopy in neuroanatomy
in: Contemporary research methods in neuroanatomy
(edt. W.J.H. NAUTA & S.O.E. EBBESSON)
Springer, Berlin (1970 b) 275-314

56) FUXE, K.; HÖKFELT, T. & UNGERSTEDT, U.
Localization of indolealkylamines in CNS
Advanc. Pharmacol. 6A (1968) 235-251

57) FUXE, K.; HÖKFELT, T. & UNGERSTEDT, U.
Morphological and functional aspects of central monoamine neurons.
Int. Rev. Neurobiol. 13 (1970 a) 93-126

58) GAL, E.M.; ARMSTRONG, J.C. & GINSBERG, B.
The nature of in vitro hydroxylation of l-tryptophan by brain tissue.
J. Neurochem. 13 (1966) 643-654

59) GAL, E.M.; ROGGEVEEN, A.E. & MILLARD, S.A.
DL-(2-^{14}C)p-chlorophenylalanine as an inhibitor of tryptophan 5-hydroxylase.
J. Neurochem. 17 (1970) 1221-1235

60) GARCIA, A.G.; KIRPEKAR, S.M. & PRAT, J.C.
A calcium ionophore stimulating the secretion of catecholamines from the cat adrenal.
J. Physiol. 244 (1975) 253-262

61) GLOWINSKI, J. & IVERSEN, L.L.
Regional studies of catecholamines in the rat brain - I The disposition of (^{3}H)norepinephrine, (^{3}H)dopamine and (^{3}H)DOPA in various regions of the brain.
J. Neurochem. 13 (1966) 655-669

62) GÖTHERT, M.; DÜHRSEN, U.; LANGEFELD, R. & BEIMS-DIEKAMP,C.
Effects of alcohols, anaesthetics and neuroleptics on the noradrenaline release induced by activation of presynaptic nicotine and tryptamine receptors.
in: Advances in the biosciences.
(edt. S.Z. LANGER; K. STARKE & M.L. DUBOCOVICH)
Pergamon Press, Oxford, 18 (1979) 333-339

63) GRAHAME-SMITH, D.G.
Studies in vivo on the relationship between brain tryptophan, brain 5-HT synthesis and hyperactivity in rats treated with a monoamine oxydase inhibitor and L-tryptophan.
J. Neurochem. 18 (1971) 1053-1066

64) GREEN, A.R.; KOSLOW, S.H. & COSTA, E.
Identification and quantitation of an new indolealkylamine in rat hypothalamus.
Brain Res. 51 (1973) 371-374

65) HAMON, M.; BOURGOIN, S.; JAGGER, J. & GLOWINSKI, J.
Effects of LSD on synthesis and release of 5-HT in rat brain slices.
Brain Res. 69 (1974) 265-280

66) HARVEY, J.A.;SCHLOSBERG, A.J. & YUNGER, L.M.
Effect of p-chlorophenylalanine and brain lesions on pain sensitivity and morphine analgesia in the rat.
in: Advances in biochemical psychopharmacology 'Serotonin':

new vistas, histochemistry and pharmacology' (edt. E. COSTA & P. GREENGARD)
Raven Press, New York 10 (1974) 233-245

67) HEIKKILA, R.E.; ORLANSKY, H. & COHEN, G.
Studies on the distinction between uptake inhibition and release of (^{3}H)dopamine in rat brain tissue slices.
Biochem. Pharmacol. 24 (1975) 847-852

68) HO, B.T.; McISAAC, W.M.; WALKER, K.E. & ESTEVEZ, V.
Inhibitors of monoamine oxidase.
Influence of methyl substitution on the inhibitory activity of ß-carbolines.
J. Pharmacol. Sci. 57 (1968) 269-274

69) HOLZ, R.W. & COYLE, J.T.
The effects of various salts, temperature, and the alkaloids veratridine and batrachotoxin on the uptake of (^{3}H)dopamine into synaptosomes from rat striatum.
Mol. Pharmacol. 10 (1974) 746-758

70) HONECKER, H. & ROMMELSPACHER, H.
Tetrahydronorharmane (tetrahydro-ß-carboline), a physiologically occurring compound of indole metabolism.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 305 (1978) 135-141

71) HSU, L.L. & MANDELL, A.J.
Enzymatic formation of tetrahydro-ß-carboline from tryptamine and 5-methyltetrahydrofolic acid in rat brain fractions: regional and subcellular distribution.
J. Neurochem. 24 (1975) 631-636

72) ISHIDA, H.; SASA, M.; TAKAORI, S. & ISHIDA, H.
Effects of harmaline on membrane excitability and ATPase activity of the crayfish giant axon.
Japan. J. Pharmacol. 31 (1981) 801-807

73) IVERSEN, L.L.
Metabolism of catecholamines.
in: Handbook of neurochemistry.
(edt. A. LAJTHA) Plenum Press, New York 4 (1970a) 197-220

74) IVERSEN, L.L.
Neuronal uptake processes for amines and amino acids.
Biochemistry of simple neuronal models.
Adv. Biochem. Psychopharmacol. 2 (1970b) 109-132

75) IVERSEN, L.L. & JOHNSTON, G.A.R.
Gaba uptake in rat central nervous system: comparison of uptake in slices and homogenates and the effects of some inhibitors.
J. Neurochem. 18 (1971) 1939-1950

76) JACOBS, B.L.
An animal behavior model for studying central serotonergic synapses.
Life Sci. 19 (1976) 777-786

77) JONAKAIT, G.M.; TAMIR, H.; RAPPORT, M.M. & GERSHON, M.D.
Detection of a soluble serotonin-binding protein in the mammalian myenteric plexus and other peripheral sites of serotonin storage.
J. Neurochem. 28 (1977) 277-284

78) KARI, I.; PEURA, P. & AIRAKSINEN, M.M.
Mass fragmentographic determination of tetrahydro-ß-carboline in human blood platelets and plasma.
Med. Biol. 57 (1979) 412-414

79) KATZ, B. & MILEDI, R.
Further study of the role of calcium in synaptic transmission.
J. Physiol. 207 (1970) 789-801

80) KERKUT, G.A.; SEDDEN, C.B. & WALKER, R.J.
Uptake of DOPA and 5-hydroxytryptophan by monoamine-forming neurones in the brain of Helix aspersa.
Comp. Biochem. Physiol. 23 (1967) 159-162

81) KOPIN, I.J.
False adrenergic transmitters.
Annu. Rev. Pharmacol. 8 (1968) 377-394

82) KOPIN, I.J.; BREESE, G.R.; KRAUSS, K.R. & WEISE, V.K.
Selective release of newly synthesized norepinephrine from the cat spleen during symathetic nerve stimulation.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 161 (1968) 271-278

83) LADURON, P.M.
N-Methylation of dopamine to epinine in brain tissue using N-methyltetrahydrofolic acid as the methyl donor.
Nature N. Biol. 238 (1972) 212-213

84) LANGEN, de C.D.J. & MULDER, A.H.
Compartmental analysis of the accumulation of ^{3}H-dopamine in synaptosomes from rat corpus striatum.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 308 (1979) 31-39

85) LANGEN, de C.D.J. & MULDER, A.H.
Effects of psychotropic drugs on the distribution of ^{3}H-dopamine into compartments of rat striatal synaptosomes and on subsequent depolarization-induced ^{3}H-dopamine release.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311 (1980) 169-177

86) LANGEN, de C.D.J.; STOOF, J.C. & MULDER, A.H.
Studies on the nature of the releasable pool of dopamine in synaptosomes from rat corpus striatum: depolarization-induced release of ^{3}H-dopamine from superfused synaptosomes labelled under various conditiones.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 308 (1979) 41-49

87) LEVI, G.; POCE, U. & RAITERI, M.
Uptake and exchange of GABA and glutamate in isolated nerve endings. Transport phenomena in the nervous system. Physiological and pathological aspects.
Adv. Exp. Med. Biol. 69 (1976) 273-289

88) LEVI, G. & RAITERI, M.
Synaptosomal transport processes.
in: International review of neurobiology. (edt. C.C. PFEIFFER & I.R. SMYTHIES) Academic Press, New York 19 (1976) 51-74

89) MANDEL, L.R.; ROSEGAY, A.; WALKER, R.W.; HEUVEL, van den W.J.A. & ROCKACH, J.
5-methyltetrahydrofolic acid as a mediator in the formation of pyridoindoles.
Science 186 (1974) 741-743

90) MARCHBANKS, R.M.
Turnover and release of acetylcholine.
in: Synapses. (edt. G.A. COTTRELL & P.N.R. USHERWOOD) Blackie, Glasgow (1977) 81-101

91) MARCHBANKS, R.M.
The vesicular hypothesis questioned.
Trends Neurosci. 1 (1978) 83-84

92) MARSDEN, C.A. & CURZON, G.
Effects of lesions and drugs on brain tryptamine.
J. Neurochem. 23 (1974) 1171-1176

93) MARTIN, W.R.; SLOAN, J.W.; CHRISTIAN, S.T. & CLEMENTS, T.H.
Brain levels of tryptamine.
Psychopharmacologia 24 (1972) 331-346

94) MATTHAEI, H.; LENTZEN, H. & PHILIPPU, A.
Competition of some biogenic amines for uptake into synaptic vesicles of the striatum.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293 (1976) 89-96

95) MATUSSEK, N.
Die Catecholamin- und Serotoninhypothese der Depression.
in: Das depressive Syndrom (edt. H. HIPPIUS & H. SELBACH)
Urban & Schwarzenberg, München (1969) 3-8

96) MATUSSEK, N.
Biochemie der Depression.
J. Neural Transm. 33 (1972) 223-234

97) MAXWELL, R.A.; FERRIS, R.M. & BURCSU, J.E.
Structural requirements for inhibition of noradrenaline uptake by phenethylamine derivates, desipramine, cocaine and other compounds.
in: The mechanism of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines
(edt. D.M. PATON) Raven Press, New York (1976) 95-153

98) McBRIDE, W.J.; HYDE, T.P.; SMITH, J.E.; LANE, J.D. & APRISON, M.H.
Effects of tryptophan on serotonin in nerve endings.
J. Neurochem. 26 (1976) 175-178

99) McILWAIN, H. & SNYDER, S.H.
Stimulation of piriform- and neo-cortical tissues in an in vitro flow-system: metabolic properties and release of putative neurotransmitters.
J. Neurochem. 17 (1970) 521-530

100) McISAAC, W.M.
Formation of 1-methyl-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-2-carboline under physiological conditions.
Biochim. Biophys. Acta 52 (1961) 607-609

101) McISAAC, W.M. & ESTEVEZ, V.
Structure-action relationship of ß-carbolines as monoamine oxidase inhibitors.
Biochem. Pharmacol. 15 (1966) 1625-1627

102) MELLER, E.; FRIEDMAN, E.; SCHWEITZER, J.W. & FRIEDHOFF, A.J.
Tetrahydro-ß-carbolines: specific inhibitors of type A monoamine oxidase in rat brain.
J. Neurochem. 28 (1977) 995-1000

103) MELLER, E.; ROSENGARTEN, H.; FRIEDHOFF, A.J.; STEBBINS, R.D. & SILBER, R.
5-methyltetrahydrofolic acid is not a methyl donor for biogenic amines: enzymatic formation of formaldehyde.
Science 187 (1975) 171-173

104) MOIR, A.T.B. & ECCLESTON, D.
The effects of precursor loading in the cerebral metabolism of 5-hydroxyindoles.
J. Neurochem. 15 (1968) 1093-1108

105) MULDER, A.H.; BERG, van den W.B. & STOOF, J.C.
Calcium-dependent release of radiolabeled catecholamines and serotonin from rat brain synaptosomes in a superfusion system.
Brain Res. 99 (1975) 419-424

106) MULDER, A.H. & SNYDER, S.H.
Potassium-induced release of amino acids from cerebral cortex and spinal cord slices of the rat.
Brain Res. 76 (1974) 297-308

107) MULDER, A.H.; WEMER, J. & LANGEN, de C.D.J.
Presynaptic receptor-mediated inhibition of noradrenaline release from brain slices and synaptosomes by noradrenaline and adrenaline.
in: Advances in the biosciences. (edt. S.Z. LANGER; K. STARKE & M.L. DUBOCOVICH)
Pergamon Press, Oxford 18 (1979) 219-224

108) MULDER, A.H.; YAMAMURA, H.I.; KUHAR, M.J. & SNYDER, S.H.
Release of acetylcholine from hippocampal slices by potassium depolarization: dependence on high affinity choline uptake.
Brain Res. 70 (1974) 372-376

109) MUSACCHIO, J.M.; FISCHER, J.E. & KOPIN, I.J.
Subcellular distribution and release by sympathetic nerve stimulation of dopamine and α-methyl dopamine.
J. Pharmac. exp. Ther. 152 (1966) 51-55

110) MYTILINEOU, C.; COHEN, G. & BARRETT, R.
Tetrahydroisoquinoline alkaloids: uptake and release by adrenergic nerves in vivo.
Europ. J. Pharmacol. 25 (1974) 390-401

111) NEISES, M. & ROMMELSPACHER, H.
Influence of tetrahydronorharmane (THN, tetrahydro-β-carboline) on the potassium-evoked efflux of (^{3}H)-5-HT and vice versa.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311 (1980) R 71

112) NG, L.K.Y.; CHASE, T.N. & KOPIN, I.J.
Drug-induced release of ^{3}H-norepinephrine and ^{3}H-serotonin from brain slices.
Nature 228 (1970) 468-469

113) NG, K.Y.; COLBURN, R.W. & KOPIN, I.J.
Effects of L-dopa on efflux of cerebral monoamines from synaptosomes.
Nature (London) 230 (1971) 331-332

114) ORREGO, F.
Criteria for the identification of central neurotransmitters, and their application to studies with some nerve tissue preparations in vitro.
Neuroscience 4 (1979) 1037-1057

115) ORREGO, F. & MIRANDA, R.
Effects of tetrodotoxin, elevated calcium and calcium antagonists on electrically induced ^{3}H-noradrenaline release from brain slices.
Europ. J. Pharmacol. 44 (1977) 275-278

116) OSBORNE, N.N.
Do snail neurones contain more than one neurotransmitter?
Nature 270 (1977) 622-623

117) OSBORNE, H. & HERZ, A.
K^{+}-evoked release of met-enkephalin from rat striatum in vitro: effect of putative neurotransmitters and morphine.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 310 (1980) 203-209

118) OSMOND, H. & SMYTHIES, J.
Schizophrenia: a new approach.
J. Ment. Sci. 98 (1952) 309-315

119) PAGE, I.H. & CARLSSON, A.
Serotonin.
in: Handbook of neurochemistry. (edt. A. LAJTHA) Plenum Press, New York 4 (1970) 251-262

120) PANNIER, L.
Über den modulierenden Einfluß von Tetrahydronorharman (THN) auf 5-hydroxytryptaminerge und dopaminerge Neurone.
Inaug. Diss., Med. Fachbereiche, Freie Universität Berlin 1979

121) PANNIER, L. & ROMMELSPACHER, H.
Mutual impact of dopaminergic and serotonergic neurons in the CNS assessed by the effects of tetrahydronorharmane (THN), a serotonin-like agent.
11. CINP Congress, Vienna, Abstract 34, 1978

122) PANNIER, L. & ROMMELSPACHER, H.
Actions of tetrahydronorharmane (tetrahydro-ß-carboline) on 5-hydroxytryptamine and dopamine mediated mechanisms.
Neuropharmacology 20 (1981) 1-8

123) PATON, W.D.M.
Central and synaptic transmission in the nervous system (pharmacological aspects).
Ann. Rev. Physiol. 20 (1958) 431-470

124) PATON, D.M.
Evidence for carrier-mediated efflux of noradrenaline from the axoplasm of adrenergic nerves in rabbit atria.
J. Pharm. Pharmacol. 25 (1973) 265-267

125) PEARSON, A.G.M. & TURNER, A.J.
The formation of ß-carboline alkaloids mediated by serine hydroxymethyltransferase.
FEBS Letters 98 (1979) 96-98

126) PEURA, P.; MACKENZIE, P.; KOIVUSAARI, U. & LANG, M.
Increased fluidity of a model membrane caused by tetrahydro-ß-carbolines.
J. Mol. Pharmacol. 22 (1982) 721-724

127) PRAAG, van H.M.
Significance of biochemical parameters in the diagnosis, treatment, and prevention of depressive disorders.
Biol. Psychiat. 12 (1977) 101-131

128) PRAAG, van H.M.
Dopamine and the development of disorders of human behaviour
in: The neurobiology of dopamine. (edt. A.S. HORN; J. KORF & B.H.C. WESTERINK) Academic Press, London (1979) 655-677

129) RADER, J.I. & HUENNEKENS, F.M.
Folate coenzyme-mediated transfer of one-carbon groups
in: The enzymes (edt. P.D. BOYER) Academic Press, New York, London 9 (1973) 197-223

130) RAITERI, M.; ANGELINI, F. & LEVI, G.
A simple apparatus for studying the release of neurotransmitters from synaptosomes.
Europ. J. Pharmacol. 25 (1974) 411-414

131) RAITERI, M.; BERTOLLINI, A.; CARMINE, del R. & LEVI, G.
Release of biogenic amines from isolated nerve endings.
Transport phenomena in the nervous system. Physiological and pathological aspects.
Adv. Exp. Med. Biol. 69 (1976) 319-335

132) RAITERI, M.; CARMINE, del R.; BERTOLLINI, A. & LEVI, G.
Effect of desmethylimipramine on the release of (^{3}H)norepinephrine induced by various agents in hypothalamic synaptosomes.
Mol. Pharmacol. 13 (1977) 746-758

133) RAITERI, M.; CERVONI, A.M.; CARMINE, del R. & LEVI, G.
Lack of presynaptic autoreceptors controlling dopamine release in striatal synaptosomes.
in: Advances in the biosciences. (edt. S.Z. LANGER; K. STARKE & M.L. DUBOCOVICH) Pergamon Press, Oxford 18 (1979) 225-230

134) RAITERI, M.; LEVI, G. & FEDERICO, R.
Stimulus-coupled release of unmetabolized ^{3}H-norepinephrine from rat brain synaptosomes.
Pharmacol. Res. Commun. 7 (1975) 181-187

135) REDBURN, D.A.; BIELA, J.; SHELTON, D.L. & COTMAN, C.W.
Stimulus secretion coupling in vitro: a rapid perfusion apparatus for monitoring efflux of transmitter substances from tissue samples.
Anal. Biochem. 67 (1975) 268-278

136) REDBURN, D.A.; STRAMLER, J. & POTTER, L.T.
Inhibition by reserpine of calcium-dependent release of (^{3}H)norepinephrine from synaptosomes depolarized with potassium or veratridine.
Biochem. Pharmacol. 28 (1979) 2091-2094

137) ROBERTIS, de E.
Synaptic receptor proteins. Isolation and reconstitution in artificial membranes.
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 73 (1975) 9-38

138) ROMMELSPACHER, H.
Tetrahydronorharman und andere neurotrope Kondensationsprodukte zwischen Aldehyden und biogenen Aminen.
Habilitationsschrift, Med. Fachbereiche, Freie Universität Berlin, 1978

139) ROMMELSPACHER, H.; BADE, P.; COPER, H. & KOSSMEHL, G.
Inhibition of the reuptake of serotonin by tryptoline.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 292 (1976) 93-95

140) ROMMELSPACHER, H.; GREINER, B.
Formation of ß-carbolines: a new metabolic pathway of indoles in the brain of rats.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., Suppl. to Vol. 302 (1978) R60

141) ROMMELSPACHER, H.; HONECKER, H.; BARBEY, M. & MEINKE, B.
6-hydroxy-tetrahydronorharmane (6-hydroxy-tetrahydro-ß-carboline), a new active metabolite of indolealkylamines in man and rat.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 310 (1979) 35-42

142) ROMMELSPACHER, H.; KAUFFMANN, H.; HEYCK-COHNITZ, C. & COPER, H.
Pharmacological properties of tetrahydronorharmane (tryptoline).
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 298 (1977) 83-91

143) ROMMELSPACHER, H. & NEISES, M.
Evidence for tetrahydronorharmane (THN, tetrahydro-ß-carboline) as a putative neurotransmitter.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 308 (1979) R 42

144) ROMMELSPACHER, H.; STRAUSS, S. & HEYCK-COHNITZ, C.
Inhibition of 5-hydroxytryptamine uptake by tetrahydronorharmane in vivo.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 303 (1978a) 229-233

145) ROMMELSPACHER, H.; STRAUSS, S.M. & REHSE, K.
ß-carbolines: a tool for investigating structure-activity relationships of the high-affinity uptake of serotonin, noradrenaline, dopamine, GABA and choline into a synaptosome-rich fraction of various regions from rat brain.
J. Neurochem. 30 (1978b) 1573-1578

146) ROMMELSPACHER, H. & SUBRAMANIAN, N.
Tetrahydronorharmane modulates the depolarisation-induced efflux of 5-hydroxytryptamine and dopamine and is released by high potassium concentration from rat brain slices.
Europ. J. Pharmacol. 56 (1979) 81-86

147) ROSENGARTEN, H.; MELLER, E. & FRIEDHOFF, A.J.
Synthesis of tetrahydro-ß-carbolines from indoleamines via enzymatic formation of formaldehyde from 5-methyltetrahydrofolic acid.
Biochem. Pharmacol. 24 (1975) 1759-1762

148) ROSS, S.B.
Interactions between reserpine and various compounds on the accumulation of (^{14}C)5-hydroxytryptamine and (^{3}H)noradrenaline in homogenates from rat hypothalamus.
Biochem. Pharmacol. 28 (1979) 1085-1088

149) ROTSZTEJN, W.H.
Neuromodulation in neuroendocrinology.
Trends Neurosci. 3 (1980) 67-70

150) SACHS, L.
Angewandte Statistik. Statistische Methoden und ihre Anwendung
Springer-Verlag, Berlin (1978)

151) SAHEB, S.E. & DAJANI, R.M.
1-methyl-6-hydroxytetrahydrocarboline: a possible product of ethanol and tryptophan metabolism.
Comp. gen. Pharmacol. 4 (1973) 225-227

152) SALDATE, C. & ORREGO, F.
Electrically induced release of (^{3}H)-5-hydroxytryptamine from neocortical slices in vitro: influence of calcium but not of lithium ions.
Brain Res. 99 (1975) 184-188

153) SCHWARTZ, A.; LINDENMAYER, G.E. & ALLEN, J.C.
The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects.
Pharmac. Rev. 27 (1975) 3-134

154) SEGAWA, T.; MURAKAMI, H.; INOUYE, A. & TANAKA, Y.
Effect of reserpine, ouabain and p-chloromercuribenzoate on the release of 5-hydroxytryptamine from rat brain synaptosomes.
Japan. J. Pharmacol. 28 (1978a) 158-160

155) SEGAWA, T. ; MURAKAMI, H.; INOUYE, A. & TANAKA, Y.
Influences of cholchicine, vinblastine and cytochalasin on the release of 5-hydroxytryptamine from rat brain synaptosomes.
J. Neurochem. 30 (1978b) 175-180

156) SELLSTROM, Å.; VENEMA, R. & HENN, F.
Functional assessment of GABA uptake or exchange by synaptosomal fractions.
Nature 264 (1976) 652-653

157) SHOEMAKER, D.W.; CUMMINS, J.T. & BIDDER, T.G.
ß-carbolines in rat arcuate nucleus.
Neuroscience 3 (1978) 233-239

158) SHORE, P.A.
Transport and storage of biogenic amines.
Ann. Rev. Pharmacol. 12 (1972) 209-226

159) SIMON, J.R.; MARTIN, D.L. & KROLL, M.
Sodium-dependent efflux and exchange of GABA in synaptosomes.
J. Neurochem. 23 (1974) 981-991

160) SKOU, J.C.
Further investigations on a Mg^{++} + Na^{+}-activated adenosintriphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na^{+} and K^{+} across the nerve membrane.
Biochim. biophys. Acta 42 (1960) 6-23

161) SKOU, J.C.
Enzymatic basis for active transport of Na^{+} and K^{+} across cell membrane.
Physiol. Rev. 45 (1965) 596-617

162) SLOTKIN, T.A.
Reserpine.
in: Neuropoisons their pathophysiological actions.
(edt. L.L. SIMPSON & D.R. CURTIS)
Plenum Press, New York 2 (1974) 1-60

163) SLOTKIN, T.A.; SALVAGGIO, M.; LAU, C. & KIRKSEY, D.F.
^{3}H-dopamine uptake by synaptic storage vesicles of rat whole brain and brain regions.
Life Sci. 22 (1978) 823-830

164) SNYDER, S.H.; KUHAR, M.J.; GREEN, A.I.; COYLE, J.T. & SHASKAN, E.G.
Uptake and subcellular lokalization of neurotransmitters in the brain.
Int. Rev. Neurobiol. 13 (1970) 127-157

165) SOMOGYI, J. & BUDAI, M.
Über die Wirkung der Ca-Ionen auf die durch Na^{+} und K^{+} aktivierbare Adenosintriphosphatase des Hirngewebes.
Z. phys. Chem. 336 (1964) 264-270

166) SOURKES, T.L.
Possible new metabolites mediating actions of L-dopa.
Nature 229 (1971) 413-414

167) SPECTOR, S.; GORDON, R.; SJOERDSMA, A. & UDENFRIEND, S.
End-product inhibition of tyrosine hydroxylase as a possible mechanism for regulation of norepinephrine synthesis.
Mol. Pharmacol. 3 (1967) 549-555

168) STARKE, K. & ENDO, T.
Presynaptic α-adrenoceptors.
Gen. Pharmacol. 7 (1976) 307-312

169) STARKE K.; REIMANN, W.; ZUMSTEIN, A. & HERTTING, G.
Effect of dopamine receptor agonists and antagonists on release of dopamine in the rabbit caudate nucleus in vitro.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 305 (1978) 27-36

170) STARKE, K.; TAUBE, H.D. & BOROWSKI, E.
Presynaptic receptor systems in catecholaminergic transmission.
Biochem. Pharmacol. 26 (1977) 259-268

171) SUBRAMANIAN, N. & MULDER, A.H.
Potassium-induced release of tritiated histamine from rat brain tissue slices.
Europ. J. Pharmacol. 35 (1976) 203-206

172) SUBRAMANIAN, N. & MULDER, A.H.
Modulation by histamine of the efflux of radiolabeled catecholamines from rat brain slices.
Europ. J. Pharmacol. 43 (1977) 143-152

173) TAUC, L.
Are vesicles necessary for release of acetylcholine at cholinergic synapses?
Biochem. Pharmacol. 28 (1979) 3493-3498

174) THOA, N.B.; COSTA, J.L.; MASS, J. & KOPIN, I.J.
Mechanism of release of norepinephrine from peripheral adrenergic neurons by the calcium ionophores X 537A and A 23187.
Life Sci. 14 (1974) 1705-1719

175) TIPTON, K.F.; HOUSLAY, M.D. & TURNER, A.J.
Metabolism of aldehydes in brain.
Essays Neurochem. Neuropharmacol. 1 (1977) 103-138

176) TURNER, A.J.
The roles of folate and pteridine derivatives in neurotransmitter metabolism.
Biochem. Pharmacol. 26 (1977) 1009-1014

177) UDENFRIEND, S. & TITUS, E.
The 5-hydroxyindole pathway of tryptophan metabolism.
in: Symposium on amino acid metabolism. (edt. W.D. Mc ELROY & B. GLASS)
John Hopkins Press, Oxford (1955) 945-949

178) VARGAS, O.; LORENZO, de D.M.C. & ORREGO, F.
Effect of elevated extracellular potassium on the release of labelled noradrenaline, glutamate, glycine, ß-alanine and other amino acids from rat brain cortex slices
Neuroscience 2 (1977) 383-390

179) VARGAS, O. & ORREGO, F.
Elevated extracellular potassium as a stimulus for releasing (^{3}H)norepinephrine and (^{14}C)α-aminoisobutyrate from neocortical slices. Specificity and calcium dependency of the process.
J. Neurochem. 26 (1976) 31-34

180) VEJDĚLEK, Z.J.; TRČKA, V. & PROTIVA, M.
Synthetic experiments in the group of hypotensive alkaloids-XXI.
Chemistry of 1,2,3,4-tetrahydronorharmane-1-carboxylic acid and derivatives.
J. Med. Pharm. Chem. 3 (1961) 427-440

181) VIZI, E.S.
Na^{+}-K^{+}-activated adenosinetriphosphatase as a trigger in transmitter release.
Neuroscience 3 (1978) 367-384

182) WESTERN, O.C. & OZBURN, E.E.
Methanol and formaldehyde in normal body tissues and fluids.
U. S. Naval Med. Bull. 49 (1949) 574-575

183) WHITTAKER, V.P.
The use of synaptosomes in the study of synaptic and neural membrane function.
in: Structure and function of synapses. (edt. G.D. PAPPAS & D.P. PURPURA)
Raven Press, New York (1972) 87-100

184) WHITTAKER, V.P.
The biochemistry of synaptic transmission.
Naturwissenschaften 60 (1973) 281-289

185) WYATT, R.J.; ERDELYI, E.; DoAMARAL, J.R.; ELLIOTT, G.R.; RENSON, J. & BARCHAS, J.D.
Tryptoline formation by a preparation from brain with 5-methyltetrahydrofolic acid and tryptamine.
Science 187 (1975) 853-855

186) WYATT, R.J.; TERMINI, B.A. & DAVIS, J.
Biochemical and sleep studies of schizophrenia: a review of the literature 1960-1970.
Schiz. Bull. 4 (1971) 10-66

187) ZEMAN, W. & MAITLAND-INNES, J.R.
Craigie's neuroanatomy of the rat.
Academic Press, New York - London 1963

188) ZIMMERMANN, H.
Commentary: vesicle recycling and transmitter release.
Neurosci. 4 (1979) 1773-1803

Lebenslauf

1950 08.04. geboren in Wasserliesch, Kreis Trier

1969 21.06. Reifeprüfung am Auguste-Viktoria-Gymnasium, Trier
WS 69/70 Studienbeginn an der Universität Bonn

1974 25.07. Abschluß der ersten philologischen Staatsprüfung am wissenschaftlichen Prüfungsamt Bonn in den Fächern Biologie und Ernährungswissenschaften
01.08. Beginn der Promotion über Probleme der Zelldifferenzierung am FB 01 medizinische Grundlagenforschung, Molekularbiologie und Biochemie der FU-Berlin

1976 Beginn des Studiums der Humanmedizin im SS 76 an der FU Berlin

1977 10.06. Promotion zum Dr. rer. nat.
01.04.77 bis 31.03.80 studentischer Tutor am Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Betreuung des Praktikums Biochemie für Medizinstudenten

1978 22.03. Ärztliche Vorprüfung am Landesprüfungsamt für Medizin, Berlin

1979 22.03. Ärztliche Prüfung, erster Abschnitt, ebenda

1981 20.03. Ärztliche Prüfung, zweiter Abschnitt, ebenda
SS 81 Immatrikulation an der Medizinischen Hochschule Hannover

1982 28.04. Abschluß der Ärztlichen Prüfung am Niedersächsischen Landesprüfungsamt für Medizin
25.05. Erteilung der Approbation als Arzt
15.10. Anstellung als Assistenzarzt in der gynäkologischen und geburtshilflichen Abteilung des Kreiskrankenhauses Großburgwedel

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Neuropsychopharmakologie der Freien Universität Berlin unter Leitung von Prof. Dr. H. Coper angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Rommelspacher danke ich für die Betreuung der Arbeit.